

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. Schmutterer
Arbeitsgruppe Pflanzenvirologie: Prof. Dr. H. L. Sängers

**Untersuchungen
zur biologischen Charakterisierung der Erreger
der Exocortis-Krankheit von Citrus und der
Spindelknollensucht der Kartoffel**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich 16 „Angewandte Biologie“
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Dipl. Ing. agr. Enrique Buchner
aus Santiago/Chile

Gießen 1974

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. Schmutterer
Arbeitsgruppe Pflanzenvirologie: Prof. Dr. H. L. Säger

Untersuchungen
zur biologischen Charakterisierung der Erreger
der Exocortis-Krankheit von Citrus und der
Spindelknollensucht der Kartoffel

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich 16 „Angewandte Biologie“
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Dipl. Ing. agr. Enrique Buchner
aus Santiago/Chile

Gießen 1974

Vervielfältigt mit Unterstützung des
Deutschen Akademischen Austauschdienstes



D e k a n : Professor Dr. W. Schuster

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.L. Säger

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Feucht

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1974

1. EINLEITUNG

1.1. Zielsetzung

1.2. Projektziele

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Beschreibung der Brückenbauarten und Bauweisen

2.1.1. Stabtragwerke

2.1.2. Stabtragwerke mit Stützen

2.2. Bauweise

2.3. Material und Bauweise

2.3.1. Materialwahl

2.3.2. Materialwahl

2.4. Bauweise

2.4.1. Bauweise

2.4.2. Bauweise

2.5. Bauweise

2.5.1. Bauweise

2.5.2. Bauweise

2.6. Bauweise

2.6.1. Bauweise

2.6.2. Bauweise

2.6.3. Bauweise

2.6.4. Bauweise

2.6.5. Bauweise

2.6.6. Bauweise

2.6.7. Bauweise

2.6.8. Bauweise

2.6.9. Bauweise

2.6.10. Bauweise

2.6.11. Bauweise

2.6.12. Bauweise

2.6.13. Bauweise

2.6.14. Bauweise

2.6.15. Bauweise

2.6.16. Bauweise

2.6.17. Bauweise

2.6.18. Bauweise

2.6.19. Bauweise

Der Mensch muß die Brücke von seelenloser
Materie zum anderen Menschen hinschlagen.
Muß Technik durchschaubar, begreifbar machen.
Erst dann können ganz andere Menschen mit
ganz anderen Leben sie verstehen, annehmen,
sich für ihren Fortschritt nutzbar machen.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Problemstellung	3
2. LITERATURÜBERSICHT	5
2.1. Beschreibung der Krankheiten und Nomenklatur	5
2.1.1. Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)	5
2.1.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)	9
2.2. Der Begriff "Viroid"	11
2.3. Wirts- und Testpflanzen	12
2.3.1. Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)	12
2.3.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)	17
2.4. Übertragung	19
2.4.1. Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)	20
2.4.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)	21
2.5. Geographische Verbreitung	22
2.5.1. Exocortis-Krankheit von Citrus	22
2.5.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)	25
2.6. Wirtschaftliche Bedeutung	27
2.6.1. Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)	27
2.6.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)	28
2.7. Bekämpfung	29
2.7.1. Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)	29
2.7.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)	31
3. MATERIAL UND METHODEN	33
3.1. Viroidherkünfte	33
3.2. Anzucht der Versuchspflanzen	33
3.3. Testverfahren	34
3.3.1. Inokulation von Exocortis auf Gynura	34
3.3.2. Inokulation von PSTV auf Tomate	34

	<u>Seite</u>
3.4. Viroidvermehrung	35
3.5. Bestimmungen der physikalischen Eigenschaften	35
3.5.1. Verdünnungsendpunkt	35
3.5.2. Die Beständigkeit in vitro bei +4°C	36
3.6. Viroidreinigung	36
3.6.1. Viroidreinigungsmethode nach SÄNGER	36
3.7. Disk-Elektrophorese	39
3.7.1. Apparative Ausrüstung und Methodik	40
3.8. Säulenchromatographie	41
3.9. Zusätze zur Inokulationslösung	42
3.10. Test zur Suche neuer Wirtspflanzen für das ExCV und für das PSTV	42
3.11. Test zur Bestimmung der Latenzzeit des ExCV und des PSTV	44
3.11.1. Die Bestimmung der Latenzzeit des ExCV bei Gynura	44
3.11.2. Bestimmung der Latenzzeit für das PSTV in Tomate	45
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
4.1. Mechanische Übertragung von ExCV auf Gynura	46
4.1.1. Die Fakirbett-Inokulation	46
4.1.2. Die Beziehungen zwischen der Zahl und der Tiefe der Inokulations-Einstiche und dem Infektionserfolg	47
4.1.3. Die Beziehung zwischen dem Einstich- Ort und dem Infektionserfolg	49
4.1.4. Der Einfluß drei verschiedener Inokula- tionsmethoden auf den Infektionserfolg	51
4.2. Die Ermittlung krautiger Testpflanzen für das ExCV und das PSTV	54
4.2.1. Der Wirtspflanzenkreis des ExCV	55
4.2.2. Der Wirtspflanzenkreis des PSTV	61

	<u>Seite</u>
4.3. Die Ermittlung der Samenübertragbarkeit des ExCV	67
4.4. Bestimmung der Latenzzeit für das ExCV und das PSTV	71
4.4.1. Die Latenzzeit des ExCV in <u>Gynura aurantiaca</u>	71
4.4.2. Die Latenzzeit des PSTV in Tomate, Sorte Rutgers	73
4.5. Die Bestimmung der relativen Infektiosität des ExCV in <u>Gynura aurantiaca</u>	75
4.6. Versuche zur Erhöhung des Infektionserfolges durch Zusatz von Dimethylsulfoxyd (DMSO) und DEAE-Dextran zum Inokulum	77
4.6.1. Der Einfluß von DMSO und DEAE-Dextran auf den Infektionserfolg des ExCV	79
4.6.2. Der Einfluß der Additive auf die Infektion von Tomate mit dem PSTV	82
4.7. Die Bestimmung der Verdünnungs-Endpunkte für ExCV und PSTV	85
4.8. Ermittlung der Beständigkeit in vitro	87
4.9. Analyse von ExCV- und PSTV-haltigen Gesamt-RNS-Extrakten aus Pflanzengewebe durch Chromatographie auf Bio-Gel P-200	91
4.9.1. Chromatographie von ExCV-haltiger Gesamt-RNS aus Gynura	91
4.9.2. Chromatographie von PSTV-haltiger Gesamt-RNS aus Tomate	93
4.10. Analyse der ExCV-haltigen RNS-Lösung auf einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel	96
4.11. Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Viroid-RNS	98
5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	101
6. LITERATURVERZEICHNIS	104

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Einleitung

Die Exocortiskrankheit von Citrus (30, 48) und die Spindelknollensucht der Kartoffel (77, 187) sind zwei wirtschaftlich wichtige Pflanzenkrankheiten, die beide seit etwa 25 Jahren bekannt sind und als Viruskrankheiten angesehen wurden (16, 146). Inzwischen hat sich herausgestellt, daß diese beiden Krankheiten, so verschieden sie auch auf den ersten Blick erscheinen mögen, nicht durch konventionelle Viren hervorgerufen werden, sondern durch eine neue Klasse von Krankheitserregern, den sog. "Viroiden", d. h. durch freie infektiöse Nukleinsäuremoleküle, die man auch als "nackte Mini-Viren" bezeichnen kann. Deshalb werden die Erreger beider Krankheiten in dieser Arbeit vergleichend untersucht.

Bei Untersuchungen zur Aufklärung des Erregers der Spindelknollensucht der Kartoffel fanden DIENER und RAYMER (45) im Jahre 1967 eine freie infektiöse Nukleinsäure, die ursprünglich als doppelsträngig vermutet wurde. SEMANCIK und WEATHERS vermuten 1968 (154) auch im Falle der Exocortiskrankheit von Citrus ein "nacktes" RNS-Virus, das doppelsträngig ist (153), oder eine atypische virale Nukleinsäure mit ringförmiger Struktur und ungewöhnlichen Aggregationseigenschaften darstellt. 1971 entdeckt DIENER (42), daß der Erreger des PSTV in Wirklichkeit eine kleine replizierende RNS ist, und er bezeichnet dieses neue Agens im Gegensatz zu einem konventionellen Virus als "VIROID". Unabhängig davon findet im gleichen Jahr SÄNGER (135), daß auch das Agens ExCV ein Viroid ist. Auf diese Weise wurde mit den Viroiden als den Erregern dieser beiden Pflanzenkrankheiten eine völlig neue Klasse von Pathogenen entdeckt. Diese ungewöhnlichen Krankheitserreger unterscheiden sich von den üblichen Pflanzenviren (46, 90) durch das Fehlen einer schützenden Proteinhülle, denn sie existieren in der

Zelle als eine sogenannte "freie", infektiöse Nukleinsäure. Sie sind somit auch nicht so ohne weiteres mit den klassischen Methoden der Virusforschung (75, 97, 139) nachzuweisen. Schließlich hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß diese "freie" infektiöse Nukleinsäure sehr viel kleiner (47, 149) als alle bisher bekannten infektiösen Virus-Nukleinsäuren ist. Aus allen diesen Gründen sind die bisher in der Pflanzenvirologie üblichen Methoden der Übertragung und der Charakterisierung dieses Pathogens (85, 144) nur bedingt anwendbar.

Aus dieser kurzen Übersicht wird klar, daß sich seit Beginn dieser Arbeit die Vorstellungen über die Natur und die Eigenschaften der Viroide in mehreren wesentlichen Punkten gewandelt haben und daß durch verbesserte Untersuchungsmethoden viele neue Erkenntnisse erarbeitet werden konnten. Das interessante Ergebnis beruht wohl auf der genauen Analyse der Größe der infektiösen RNS, die anfangs für einen sehr großen Doppelstrang (151) mit einem Molekulargewicht von mehreren Millionen gehalten wurde. Es stellt sich unerwarteterweise heraus, daß es sich um eine einsträngige (42) und vor allem eine ungewöhnlich kleine RNS mit einem Molekulargewicht von etwa 85.000 Dalton (+ 10 %) (136) handelt, was einer Kettenlänge von etwa 250 Nukleotiden entspricht. Damit ist sie nur etwa dreimal so groß wie die kleinste funktionelle zelleigene RNS, die Transfer-RNS und dennoch vermehrungsfähig. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß diese kleine RNS im Zellkern vorkommt, und dort offenbar mit dem Chromatin und somit möglicherweise mit den Chromosomen der Zelle assoziiert ist. Es kann sich also bei den Viroiden sicher nicht, wie ursprünglich vermutet, um die nackten Formen konventioneller Pflanzenviren handeln (137), sondern mit diesen pathogenen Nukleinsäuren ist eine neue Gruppe winziger Krankheitserreger gefunden worden, deren Existenz niemand für möglich gehalten hatte.

Die ungewöhnliche Natur der Viroide wirft natürlich viele noch ungelöste Probleme auf, von denen die Frage nach ihrem Ursprung deshalb wohl am interessantesten sein dürfte, weil sich darüber sehr intensiv spekulieren läßt. Man kann sie beispielsweise als sehr primitive oder auch als rückgebildete Viren ansehen, die offensichtlich einen einfacheren Weg für ihre Vermehrung gefunden haben und dabei auf alle "überflüssigen" Strukturen verzichten konnten. Ihre mögliche Verbindung mit der Erbsubstanz der Zelle und ihr relativ geringer potentieller Informationsgehalt führen zu der Annahme, daß es sich um eine Art Bindeglied zwischen Viren und Genen handeln könnte, die bereits früher mehrfach postuliert, aber nie gefunden wurden. Es ist sogar denkbar, daß Viroide Träger extrachromosomaler Erbeigenschaften sein könnten.

Es ist verständlich, daß diese Entdeckung anfangs sehr kritisch beurteilt wurde, denn man hatte nicht damit gerechnet, daß es neben Viren noch kleinere Krankheitserreger gibt, die in der Lage sein könnten, gesunde Zellen zu infizieren und eine regelrechte Massenproduktion von infektiösen Erregern zu veranlassen. Inzwischen ist ihre Existenz gesichert und es herrscht Übereinstimmung, daß es sich um eine der wichtigsten Entdeckungen der letzten Jahre im Bereich der Biologie handelt.

1.2 Problemstellung

Da die Erreger der Exocortiskrankheit von Citrus und der Spindelknollensucht von Kartoffel zu der gleichen neuen Gruppe von Pathogenen gehören, sollten im Rahmen dieser Dissertation vor allem die wichtigsten biologischen Eigenschaften der beiden Pathogene vergleichend untersucht werden. Die wenigen bisher in der Literatur bekannt gewordenen Ergebnisse sind vorwiegend biochemisch-molekular-

biologischer Natur und außerdem jeweils von einer einzigen Arbeitsgruppe für einen der Erreger erzielt worden. Durch Analogieschlüsse läßt sich daraus ableiten, daß beide Erreger sehr ähnlich sein müssen. Die hier gezielte Aufgabe war es daher, die beiden Pathogene unter den gleichen Bedingungen mit biologischen Methoden zu analysieren. Dabei sollte vor allem der Wirts- und Test-Pflanzenkreis vergleichend untersucht werden, da bisher keine besonders geeigneten Test-Systeme bekannt sind. Es konnte daher erwartet werden, daß sich bei dieser Gelegenheit bessere Testpflanzen auffinden lassen würden. Weiterhin waren die Methoden der Übertragung der Erreger noch nicht genügend entwickelt und standardisiert. So gab es z. B. zu Beginn der Arbeit keinen wirklich zuverlässigen biologischen Test für das Agens der Exocortis-Krankheit. Für die Interpretation und Aufklärung aller Fragen, die die Infektiosität betreffen, muß jedoch ein reproduzierbares Test-System vorhanden sein.

Da diese Arbeit ursprünglich mit ExC begann und erst später durch die Spindelknollensucht (PSTV) ergänzt wurde, wird im Rahmen dieser Arbeit diese Reihenfolge stets eingehalten werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Beschreibung der Krankheiten und Nomenklatur

2.1.1 Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)

FAWCETT und KLOTZ (57) beschrieben zum ersten Mal die Exocortiskrankheit von Citrus im Jahre 1948: "The nature or cause of exocortis (as scaly butt is called in California) is not known. It is believed that it is either due to a genetic factor ... or that it is due to a virus." ("Die Natur oder Ursache von Exocortis (scaly butt in Californien genannt) ist nicht bekannt. Man glaubt, daß der Grund in genetischen Faktoren liegt ... oder daß es durch ein Virus hervorgerufen wird"). 1949 beschrieben BENTON et al. (11) Exocortis als eine durch ein Virus hervorgerufene Krankheit, die im allgemeinen symptomlos ist. Nur wenn sie auf Citrus trifoliata wächst, zeigen sich Symptome. So galt ExCV nun als eine Viruskrankheit bis 1972, als SÄNGER (135) demonstrierte, daß es sich in Wirklichkeit um eine Viroidkrankheit handelte.

Die ExCV-Krankheit ist gekennzeichnet durch ausgeprägte Triebstauchung (BROADBENT et al. 20), sowie Loslösung größerer Rindenbereiche (BITTERS, 16). Ausgehend von der Pfropfungsstelle platzt außerdem die Rinde auf und blättert in großen Stücken vom Stamm ab. Diese Risse sind nach BENTON et al. (15) in jungen Bäumen 1 mm tief, 3 bis 8 mm breit und 10 bis 25 mm lang. Dieses Symptom wiederholt sich in regelmäßigen Zeitabständen und in größeren Bäumen werden diese Risse proportional größer und tiefer. COHEN (35) konnte zeigen, daß die Kronendurchmesser ExCV-kranker Bäume kleiner sind. FUDL-ALLAH et al. (65) haben bei erkrankten Bäumen einige abweichende anatomische Merkmale gefunden, wie z. B. eine Verdunkelung der Parenchymzellen, Hypertrophie und Hyperplasie des Gewebes, Verkörnung des Zellinhaltes, tote Zellen und nekrotisches Gewebe. Alle

diese mikroskopisch sichtbaren Symptome wurden im Gewebe der Blattunterseite von ExCV-infizierten Citrus-Blättern beschrieben. WEATHERS (175, 178) konnte zeigen, daß die Loslösung der Rinde nur dann erfolgt, wenn man hohe Mengen Stickstoff gibt. Außerdem wird hiermit auch die Inkubationszeit der Krankheit verkürzt. Die Zeit bis zur ersten Symptommerscheinung kann zwischen einigen Monaten und 8 Jahren betragen.

Da Triebstauchungen auch durch andere Viren und durch nichtviröse Faktoren verursacht werden können (KÖHLER und KLINKOWSKI, 94), beruht die Beurteilung der Krankheit im wesentlichen auf der Ausbildung der Rindensymptome als dem diagnostisch wichtigsten Merkmal.

Das Agens der Exocortis-Krankheit tritt in verschiedenen Stämmen auf, von denen einige symptomlos sind, während andere abweichende Krankheitsbilder ergeben, die eine Diagnose erschweren können (BENTON et al., 11, und BROADBENT et al., 20). In diesem Sinn wurden auch "milde" (weak) und "aggressive" (strong) Stämme beschrieben, die auf den benutzten Wirtspflanzen entsprechende Symptome hervorrufen (SALIBE, 133, WEATHERS und CALAVAN, 179, ELSAID und SINCLAIR, 56).

MEDEL (106) schlägt sogar vor, milde Stämme der ExCV zu benutzen, um durch die eintretende Stauchung und Verzweigung die Baumhöhe zu kontrollieren, was vorteilhaft für die mechanische Ernte in den Citrusanlagen sein könnte. Über Resistenzerscheinungen bei Citrus gegenüber dem ExCV ist wenig bekannt und nur BOVE und VOGEL (25) berichten, daß bestimmte Citrus-Selektionen (Nucellar-Klone) widerstandsfähiger gegen die sonst übliche Rindenablösung sind.

In Abb. 1 ist eine Exocortis-krankte Citruspflanze dargestellt, bei der die charakteristische Triebstauchung und die Epinastie der Blätter deutlich sichtbar ist.



Abb. 1 ExCV bei Citrus (Orig. Sänger)

Zum Schluß sei noch auf die Synonyme der Exocortis-Krankheit hingewiesen, die in Tab. 1 zusammengestellt sind.

Tab. Nr. 1: Synonyme der Exocortiskrankheit von Citrus und des vermuteten Erregers

Synonyme	Autor
1. Exocortis disease (virus) of Citrus	unbekannt
2. Scaly butt disease of Citrus	FAWCETT u. KLOTZ 1948 (57)
3. Citrus bark shelling (virus) disease	REITZ u. KNORR 1957 (126)
4. Rangpur lime (virus) disease	OLSON et al. 1958 (119)

Wie bei fast allen Namen auffälliger und wichtiger Krankheiten so sind auch hier die älteren Fachausdrücke wohl ursprünglich aus der Praxis übernommen worden. Heute ist nur noch der Begriff Exocortis gebräuchlich.

2.1.2 Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)

Die Spindelknollensucht der Kartoffel wurde schon 1922 durch MARTIN (104) beschrieben. In den Jahren 1926 bis 1928 präsentiert GOSS (72, 73) die ersten Hinweise, die darauf deuten, daß das Agens ein Virus ist und SCHULTZ et al. (146) beschreiben im Jahre 1934 den Krankheitserreger zum ersten Mal als ein Virus. So wurde in dieser Zeitspanne bis 1971 diese Krankheit stets als eine Viruskrankheit betrachtet bis DIENER (42) den neuen und passenden Begriff "Viroid" für den von einem konventionellen Virus abweichenden Erreger vorschlug.

Das Hauptmerkmal der Krankheit besteht nach FERNOW (60) in einer Veränderung der Knollenform: Sorten mit sonst runden oder ovalen Knollen bilden nach der Infektion lange, spindelförmige und oft stark deformierte Knollen aus. BALD et al. (8) haben herausgefunden, daß der Durchmesser im Verhältnis zur Länge der Knolle durch die Krankheit stark reduziert wird.

Abb. 2 zeigt eine Aufnahme von Spindelknollensuchtkranken Kartoffelknollen im Vergleich zu gesunden Kartoffelknollen. Die Symptome sind bei den Kartoffelstauden nicht sehr deutlich ausgebildet und sehr stark sortenabhängig. Es werden meist nur wenige steil aufgerichtete, im Wuchs gehemmte Stengel gebildet und die Blätter können etwas dunkler als bei gesunden Pflanzen sein (SCHULTZ et al., 146).

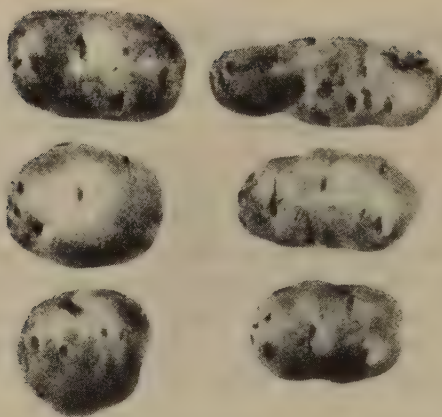


Abb. 2: PSTV-krankte Kartoffel-Knollen (rechts) im Vergleich mit gesunden Knollen (links) (Nach FOLSOM 89)

Die Untersuchungen am Agens der Spindelknollensucht wurden wesentlich erleichtert, als es gelang, das "Virus" auf Tomate zu übertragen, die deutliche Symptome von Triebstauchung, Blattrollung und Epinastie innerhalb von 2-4 Wochen nach der Infektion zeigen (RAYMER und O'BRIEN, 123, und WHITNEY und PETERSON, 188).

LEE und SINGH (98) konnten zeigen, daß durch die Zugabe von Mangan eine noch deutlichere Symptomausprägung induziert werden kann. Aus einer Arbeit von KAPUR und WEATHERS (84) zur Pathophysiologie geht schließlich hervor, daß von infizierten Tomatenpflanzen weniger Sauerstoff sowie Stickstoff aufgenommen wird und daß die Aktivität der Peroxidase und der Katalase zunimmt.

Auch das Agens des PSTV tritt in verschiedenen "Stämmen" auf und LEE und SINGH (98) haben die Tomatensorte "Allerfrüheste-Freiland" benutzt, um auch beim "milden" Stamm (M-PSTV) eine Symptomausprägung zu erhalten.

Wie aus den Arbeiten von SINGH (160), FERNOW (61) und von RAYMER und O'BRIEN (116, 123) hervorgeht, gibt es PSTV-Isolate, die zu Symptomlosigkeit, zu Nekrosen an Blattadern mit Vergilbungen und zu einer späten Symptomausprägung führen können.

Auch bei dem Erreger der Spindelknollensucht der Kartoffel sind mehrere Synonyme bekannt, die in Tabelle 2 zusammengestellt sind.

Tabelle 2: Synonyme der Spindelknollensucht von Kartoffel bzw. des vermuteten Erregers

Synonyme	Autor
1. Potato spindle tuber disease	MARTIN, 1922 (104)
2. Potato marginal leaf-roll disease	FERNOW, 1923 (60)
3. Running-long disease	SCHULTZ u. FOLSON, 1923 (145)
4. Running-out disease	SCHULTZ u. FOLSON, 1923 (145)
5. Solanum virus 12, Smith	SMITH, 1956 (169)
6. Potato virus 8; J. Johnson	SMITH, 1956 (169)
7. Potato Spindle tuber viroid	DIENER, 1968 (37)

2.2 Der Begriff "Viroid"

Mit dem Begriff "Viroid" wird heute ein neuer Typ von Pathogenen benannt, der virusähnliche Symptome in Pflanzen hervorruft. "Viroid" bedeutet virusähnlich und soll anzeigen, daß der Erreger übertragbar und infektiös ist und somit in der Wirtspflanze vermehrt wird, wo er virusähnliche Symptome auslösen kann (DIENER, 42).

Der Begriff Viroid wurde allerdings früher bereits von

ALTENBURG (1) für hypothetische Symbionten benutzt, die sich ähnlich wie Viren verhalten und die sich in Zellen von höheren Organismen durch Mutation entwickelt haben könnten. Diese ursprüngliche Viroidtheorie wurde bis heute allerdings nicht akzeptiert, da sie nicht beweisbar ist. DIENER (42) schlägt den Begriff "Viroid" für diese neue Gruppe von virusähnlichen Pathogenen vor, da er jetzt für ein reales Agens verwendet werden kann, das in seinen wesentlichen Eigenschaften dem ursprünglichen hypothetischen Agens weitgehend entspricht.

Andererseits kann man Viroide natürlich auch als Virus-Nukleinsäuren ansehen, denen eine schützende Proteinhülle fehlt. Allerdings ist die Nukleinsäure dieser Agentien sehr viel kleiner als die konventioneller Viren. In diesem Sinn hat SÄNGER (136) die Viroide auch als "Nackte Mini-Viren" bezeichnet.

Neben dem Begriff "Viroid" wurden in letzter Zeit noch andere Namen für diese Erreger vorgeschlagen. SEMANCIK und WEATHERS bevorzugen den Ausdruck "kleine pathogene RNS" und empfehlen auf Grund der Eigenschaften den neuen Begriff "Pathogene", was sinngemäß als "Patho-Gen" ins Deutsche übersetzt werden müßte. Von SINGH und CLARK (1973) (164) wurde schließlich der Begriff "Metavirus" verwendet, und es ist nicht verwunderlich, daß über solche Nomenklaturfragen bereits eine heftige Diskussion entstanden ist (McKINNEY, 108, und DIENER, 43). Jedenfalls sieht es gegenwärtig so aus, als ob sich der Begriff "Viroid" durchsetzen würde.

2.3 Wirts- und Testpflanzen

2.3.1 Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)

In Tabelle Nr. 3 sind die in der Literatur angegebenen Wirts- und Testpflanzen für das ExCV tabellarisch zusammen-

Tabelle Nr. 3: Der Wirts- und Test-pflanzen-Kreis des ExCV

Familie	Symptome	Literaturangabe
1. Rutaceae		
Citrus aurantifolia (Persian/Mexican lime)	+	CALAVAN et al. (27); GARNSEY & WHIDDEN (69); RODRIGUEZ (127)
Citrus aurantium (Bitter Orange)	+	GARNSEY & WHIDDEN (69)
" excelsa	+	CALAVAN et al. (27); BENTON et al. (14)
" jambhiri (rough lemon)	+	CALAVAN et al. (27); BENTON et al. (14)
" limon	+	GARNSEY & WHIDDEN (69)
" limonia (Kursaie/Rangpur lime)	+	CALAVAN et al. (27); GARNSEY & WHIDDEN (69); SALIBE (134); NOUR-EL-DIN & TOLBA (115); CALAVAN (26); WEATHERS & CALAVAN (179)
" limettioides (Sweet lime)	-	WEATHERS & CALAVAN (179); BENTON et al. (14)
" karna	+	NARIANI et al. (113)
" medica	+	CALAVAN et al. (26); ALLEN & ODEN (2); GARNSEY & WHIDDEN (69); WEATHERS (177)
" medica Etrog clone Arizona 861	+	ALLEN & ODEN (2)
" medica Etrog clone USDFS 60-13	+	ALLEN & ODEN (2)
" medica Eureka	+	BITTERS et al. (17); BITTERS (16); BENTON et al. (14)
" medica Harvey	+	SALIBE (134)
" sinensis (Sweet orange)	-	GARNSEY & WHIDDEN (69); SALIBE (134); NOUR-EL-DIN, TOLBA (115); SINCLAIR & BROWN (166)
" sinensis x Poncirus trifoliata (Troyer Citrange)	-	BITTERS et al. (17)
" sinensis x Poncirus trifoliata (Morton Citrange)	+	BITTERS et al. (17); WEATHERS & CALAVAN (179)
" sinensis x Tangerine (Ortanique)	+	HOSIN (78)
" sinensis var Washington Naval	-	BENTON et al. (13); SINCLAIR BROWN (166)
" sinensis var Valencia temple	-	BITTERS (16); BENTON et al. (13)
" paradisi (Grapefruit)	+	BITTERS (16)
" paradisi x C. reticulata (Orlando-Tangelo)	-	GARNSEY & WHIDDEN (69); SALIBE (134); SLEETH (168); BENTON et al. (14)
" reticulata (Mandarin var. Ling Ming)	-	GARNSEY & WHIDDEN (69); SLEETH (168)
" ponarus trifoliata	+	SALIBE (134)
	+	CALAVAN et al. (26) (27); GARNSEY & WHIDDEN (69); WEATHERS & CALAVAN (179); BITTERS (16); SINCLAIR & BROWN (165, 166)

Fortsetzung Tabelle Nr. 3:

Familie	Symptome	Literaturangabe	
2. Compositae			
Gynura aurantiaca	+	SEMANCEIK & WEATHERS (154); SÄNGER (135)	
Gynura sarmentosa	+	WEATHERS & GREER (180)	
3. Solanaceae			
Solanum aculeatissimum	+	WEATHERS et al. (181)	
" dulcamara	+	WEATHERS et al. (181)	
" hispidum	+	WEATHERS et al. (181)	
" integrifolium	+	WEATHERS et al. (181)	
" marginatum	+	WEATHERS et al. (181)	
" topiro	+	WEATHERS et al. (181)	
" quitoense	+	WEATHERS et al. (181)	
Petunia axillaris	+	WEATHERS (177)	
" hybrida	+	WEATHERS & SEMANCEIK (154); WEATHERS & GREER (180)	
" violaceae	+	WEATHERS (177)	
Physalis floridana	+	WEATHERS et al. (181)	
" peruviana	+	WEATHERS et al. (181)	
" ixocarpa	+	WEATHERS et al. (181)	

Tabelle Nr. 4: Der Wirts- und Testpflanzenkreis der PSTV

Familie	Symptome	Literaturangabe
1. Solanaceae		
Acrogenus solani	+	HOLMES (77)
Capsicum annuum	-	O'BRIEN & RAYMER (117); DIENER et al. (48)
Petunia hybrida	-	O'BRIEN & RAYMER (116, 117)
Datura stramonium	-	O'BRIEN & RAYMER (117); DIENER et al. (48)
" metel	-	O'BRIEN & RAYMER (117); DIENER et al. (48)
Lycopersicon esculentum 'Rutgers'	+	DIENER (39); O'BRIEN & RAYMER (117); DIENER et al. (48); LEE & SINGH (98)
" "		
" 'Allerfrüheste Freiland'	+	SINGH (158); LEE & SINGH (98)
" 'Bonny-Best'	+	LEE & SINGH (98)
" 'Sheyenne'	+	LEE & SINGH (98)
" 'Michigan-Ohio'	+	LEE & SINGH (98)
Nicandra physaloides	-	O'BRIEN & RAYMER (117); DIENER et al. (48)
Nicotiana glutinosa	+	O'BRIEN & RAYMER (117); DIENER et al. (48)
" rustica	-	O'BRIEN & RAYMER (116)
" debneyi	-	O'BRIEN & RAYMER (116)
" tabacum	-	DIENER et al. (48)
" " 'SAMSUN'	-	DIENER et al. (48)
" " 'Xanthi'	-	DIENER et al. (48)
" " 'Rustica'	-	DIENER et al. (48)
Scopolia sinensis	+	SINGH & CLARK (163); SINGH (160)
" carivioliola	+	SINGH (158)
" lurida	+	SINGH (158)
Solanum aviculare	+	SINGH (158)
" albiflorum	+	SINGH (158)
" berthaultii	+	EASTON & MERRIAM (54)
" boliviense	+	EASTON & MERRIAM (54)
" bulbocastanum	+	EASTON & MERRIAM (54)
" depilatum	+	EASTON & MERRIAM (54)
" fanatinae	+	SINGH (158)
" goniocalyx	+	EASTON & MERRIAM (54)
" kurtzianum	+	EASTON & MERRIAM (54)
" maglia	+	EASTON & MERRIAM (54)
" tuberosum 'Saco'	+	HOLMES (77)
Solanum polyadenum	+	EASTON & MERRIAM (54)
" Polytrichon	+	EASTON & MERRIAM (54)
" bernei	+	EASTON & MERRIAM (54)
Physalis floridana	+	DIENER et al. (48)
" peruviana	-	O'BRIEN & RAYMER (116), (117); DIENER et al. (48)

gefaßt. Man kann erkennen, daß fast alle anfälligen Pflanzen der Familie der Rutaceae oder Citrusgewächse angehören. Ausnahmen von dieser Regel bilden einige Solanaceen-Arten wie *Petunia spec.* und *Physalis spec.* und die Compositen *Gynura aurantiaca* und *G. sarmentosa*. Von diesen Pflanzenarten wird vor allem *Gynura aurantiaca* als Testpflanze benutzt, da sie bereits 2 - 4 Wochen nach der Inoculation mit dem ExCV klare Symptome zeigt. Bei vielen Citrus-Arten und -Sorten ist die Erkrankung übrigens symptomlos, was das Erkennen und Ausscheiden kranker Pflanzen sehr erschwert und ein arbeitsaufwendiges biologisches Testverfahren bedingt. Abb. 3 zeigt die Symptome von ExCV auf *Gynura aurantiaca* 6 Wochen nach der Inokulation, wobei man deutlich Blattdeformationen und Epinastie erkennen kann.



Abb. 3: ExCV auf *Gynura* (Orig. Sänger)

2.3.2 Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)

Im Gegensatz zum ExCV hat das PSTV einen sehr großen Wirtspflanzenkreis, wobei der Schwerpunkt hauptsächlich in der Familie Solanaceae liegt. Tomaten eignen sich besonders als Testpflanzen für diese Krankheit, weil sie schon nach

2 - 4 Wochen nach der Infektion deutliche Symptome von Chlorose, Epinastie und gelegentlich von Triebstauchung zeigen können. In Abb. 4 ist eine solche PSTV-krankte Tomate neben einer gesunden Pflanze abgebildet.



Abb. 4: PSTV auf Tomaten (Orig. Sänger) ;
links die gesunde Kontrollpflanze.

Dieses Symptom hängt sehr stark von den Wachstumsverhältnissen ab und tritt unter unseren mitteleuropäischen Klimabedingungen nur im Hochsommer bei hohen Temperaturen und hoher Lichtintensität auf. Im Laufe der Untersuchungen hat sich gezeigt, daß sich eine deutliche Symptomausprägung auch unter diesen Voraussetzungen entwickelt, wenn man die Pflanzen etwa 4 Wochen nach der Inokulation dekapitiert und bis zum Austrieb der Seitensprosse wartet. Man kann dann nach weiteren 10 - 14 Tagen an den Seitensprossen deutlich Symptome von Epinastie, Blattkräuselung und Triebstauchung beobachten. Die gesunden Pflanzen hingegen treiben mit normalem Wuchs aus.



Abb. 5: PSTV auf Tomaten nach Dekapitation und Austrieb der Seitensprosse; links die gesunde Kontrollpflanze. (Orig. Sänger)

In Abb. 5 ist diese Symptomverstrkung nach Dekapitation und Neuaustrieb dargestellt, zumal diese Maßnahme im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Gründen einer sicheren Beurteilung der erfolgten Infektion notwendig war.

2.4 Übertragung

Die Übertragungsweisen für die beiden Krankheiten werden in Zukunft noch einmal neu überprüft werden müssen, weil heute nicht mehr völlig auszuschließen ist, daß in vielen Versuchen Misch-Infektionen mit konventionellen und z. T. latenten Viren vorlagen, die eine positive Übertragung der Krankheit vorgetäuscht haben könnten. Unter diesem Gesichtspunkt sind die nachfolgenden Angaben wahrscheinlich nicht ganz zuverlässig und daher nur mit Einschränkung gültig.

2.4.1 Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)

Lange Zeit hat man vermutet, daß sich das ExCV mit der Pfropfung auf natürliche Weise übertragen läßt, bis 1949 BENTON et al. (11, 12, 13, 14) tatsächlich herausfanden, daß äußerlich gesund erscheinende Pfropfteile typische ExCV-Symptome entwickelten, nachdem sie auf Poncirus trifoliata oder auf bestimmte Citrus-Hybriden (MOREIRA, 111) als Unterlage gepfropft wurden. Ähnliche Pfropfergebnisse haben auch BITTERS et al. (17) und MAJORANA (102) erhalten. Und OLSON und SHELL (118) fanden schließlich, daß ExCV nur dann durch Pfropfung übertragen wird, wenn die Unterlagen vorher nicht mit Tristeza oder Xyloporosis infiziert waren, die offenbar eine Art "cross protection" gegen das ExCV induzieren. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu berücksichtigen, daß die Hauptpfropfungsquellen meistens Valencia-Orangenbäume sind, die, wie GARDNER (67) berichtet, das ExCV latent enthalten können und symptomlos erscheinen. So kann - wie BANFI (9) betont - mit Pfropfungsmaterial von solchen Mutterbäumen die ExC-Krankheit weiter übertragen werden und in ganzen Orangenplantagen latent vorhanden sein und später bei ungünstigen Bedingungen (von Klima und Düngung und Virusbefall) zu katastrophalen Ausfällen führen. Kompliziert wird diese gefährliche Situation noch weiter durch die früher nicht bekannte Beziehung zwischen Pfropfreis, Unterlage und Spätschäden durch ExCV-Latenz in Pfropfung.

In jüngster Zeit wurde auch noch eine rein mechanische Übertragung mit den Schneidewerkzeugen während des Baumschnitts nachgewiesen (GARNSEY und WHIDDEN, 69). Und ALLEN (3, 4) berichtet, daß sich das Agens an der Schneide der Messer über acht Tage Übertragungsfähig erhalten kann.

Das ExCV ist auch mit Hilfe der Kleeseide Cuscuta subinlusa übertragbar, die man stets bei schwer übertragbaren Viren zu Testzwecken verwendet. Hier sind die Arbeiten von

WEATHERS (176, 177), WEATHERS et al. (181) und WEATHERS und HARJUNG (182) zu nennen. Was die Insekten- und Samenübertragung betrifft, so liegen hierfür nur negative Ergebnisse vor, LAIRD et al. (95), FRAZER und LEVITT (62), GARNSEY und JONES (68). Das gleiche gilt auch für die Übertragung durch Nematoden, bei der NIGH und ALLEN (114) Xiphinema americanum und Longidorus elongatus und BRZESKI (22) dazu noch weitere 41 Nematoden-Arten als Vektoren ohne Erfolg testeten. Eine sehr ungewöhnliche Übertragungsform wurde von CALAVAN et al. (29) beobachtet, und zwar wurden in einer Anlage gesunde Bäume offenbar mit dem Bewässerungswasser infiziert. Die Bedeutung dieses Befundes ist völlig unklar.

Die Untersuchungen am Agens der ExCV wurden wesentlich erleichtert als es 1968 WEATHERS und GREER (180) gelang, die Krankheit durch Nadel- und Messerstiche auf die krautige Composite Gynura aurantiaca zu übertragen, die nach 3 - 4 Wochen mit eindeutigen Krankheitssymptomen reagiert (siehe Abb. 3, Seite 15).

2.4.2 Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)

Übertragungsversuche mit der Spindelknollensucht der Kartoffel wurden bereits 1923 durch SCHULTZ und FOLSON (145) durchgeführt. Schon damals haben diese Autoren gefunden, daß diese Krankheit sowohl auf mechanischem Wege als auch durch Aphiden (Blattläuse) übertragen werden kann, was nachträglich besehen natürlich sehr stark für ein Virus als den Krankheitserreger sprach. 1926 konnte GOSS (73) die mechanische Übertragung bestätigen, aber erst 1928 (72) spricht dieser Autor zum ersten Mal von einer Viruskrankheit, die durch Locustidae (Heuschrecken) übertragen wird. Die bis heute ermittelten Vektoren sind vor allem Aphiden, von denen Myzus persicae und M. mugei die bekanntesten

sind. Daneben sind auch der Kartoffelkäfer (Leptinotarsa decemlineata), die Wanze Lygus pratensis und der Blattkäfer Disonycha triangularis zur Übertragung fähig (SMITH, 169).

In den folgenden Jahren hat man sich hauptsächlich mit der mechanischen Übertragung im Feld beschäftigt. So konnten BONDE und MERIAM (24) und MERIAM und BONDE (107), z. B. nachweisen, daß das PSTV durch Traktorenräder übertragen werden kann und MANSER und MERIAM (103) konnten eine Verbreitung im Bestand nach Arbeiten mit der Egge und dem Pflug feststellen. Epidemiologisch besonders interessant sind schließlich die Befunde von HUNTER et al. (79) und SINGH (159), die sowohl bei der Kartoffel als auch bei der Tomate und die Samenübertragbarkeit des PSTV nachweisen konnten. Diese Ergebnisse unterstreichen die besondere Gefährlichkeit dieser Krankheit, die sehr leicht und beinahe automatisch verbreitet werden kann.

2.5 Geographische Verbreitung

2.5.1 Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)

Tabelle Nr. 5 enthält eine Übersicht von gesicherten Fundorten des ExCV. Es ist klar, daß das ExCV nur in Citrus-Anbaugebieten auftreten kann und daß es daher gebunden an jene Wirtspflanzen auf die warmen bis tropischen Zonen der Erde beschränkt ist. Allerdings erkennt man auf den ersten Blick, daß in Europa und in den USA Verbreitungsschwerpunkte zu liegen scheinen. In Wirklichkeit dürfte es aber so sein, daß nur hier intensivere Untersuchungen durchgeführt wurden. Diese Erfahrung gilt übrigens für viele andere Krankheiten, bei denen man ungefähr dieselbe Weltverbreitung feststellen kann. Das liegt hauptsächlich in der Forschungsintensität in diesen Weltteilen und in der relativ großen Zahl von aktiven Pflanzenpathologen begründet. Ein interessantes Beispiel dafür ist der Fall

des ExCV in Chile, wo WEATHERS aus den USA während eines Forschungsaufenthaltes die Exocortiskrankheit gefunden und dann auch beschrieben hat.

Tabelle Nr. 5: Gesicherte Fundorte für die Exocortiskrankheit von Citrus

Kontinent	Literaturangabe
<u>1. Afrika</u>	
Ägypten	NOUR-EL-DIN & TOLBA 1967 (115)
Republik Süd-Afrika	WALLACE 1961 (173)
Tunesien	JAMMONSIE 1966 (82)
<u>2. Amerika</u>	
Argentinien	ROSSETTI et al. 1965 (132); BANFI 1956 (9); DU CHARME & KNORR 1950 (50); KNORR et al. 1951 (92)
- Corrientes	RODRIGUEZ 1963 (127)
- Tucuman	FOGUET & OSTE 1968 (64)
Brasilien	MOREIRA 1955 (111); SALIBE 1961 (133)
Chile	WEATHERS et al. 1969 (183)
Jamaica	HOSEIN 1968 (78)
Surinam	KRAAIJENGA 1964 (93)
USA	
- Florida	BRZESKI 1965 (22); CHILDS & KNORR 1965 (32); KNORR et al. 1954 (91); REITZ & KNORR 1957 (126); DU CHARME & KNORR 1950 (50);
- California	FAWCETT & KLOTZ 1948 (57); CALAVAN & WEATHERS 1963 (28)
<u>3. Asien</u>	
Indien	NARIANI et al. 1968 (113)
Japan	TANAKA 1968 (172)
<u>4. Australien</u>	
	BENTON et al. 1945 (13)

Fortsetzung Tabelle 5:

Kontinent	Literaturangabe
<u>5. Europa</u>	
Frankreich	E.P.P. 1960 (55); BOVE & VOGEL 1962 (25); VOGEL 1961 (189)
Griechenland	E.P.P.O. 1960 (55)
Italien	E.P.P.O. 1960 (55); CATARA 1966 (31); BRUNO 1964 (21); ROISTACHER et al. 1967 (130); H. KEGLER 1968 (87)
Spanien	E.P.P.O. 1960 (55); ROISTACHER et al. 1967 (130)
Türkei	ÖZALP & AZERI 1968 (120)
Portugal	E.P.P.O. 1960 (55)
Jugoslavien	E.P.P.O. 1960 (55); H. KEGLER 1968 (87)
Zypern	E.P.P.O. 1960 (55) E.P.P.O. 1960 (55)

Zur Frage der allgemeinen Verbreitung des ExCV ist die Auffassung von GARDNER (67) interessant. Er berichtet, daß die Hauptpfropfungsquellen für Citrusfrüchte Valencia Orangenbäume sind, die symptomlose ExCV-Träger sein können, wenn sie nicht auf *Poncirus trifoliata* als Unterlage wachsen (BENTON et al., 14). Von solchen Bäumen wurde nach BANFI (9) in großen Mengen Pfropfungsmaterial gewonnen und in alle Welt verschickt, wobei die ExCV-Krankheit unerkannt übertragen und ausgebreitet werden konnte. Auf diese Weise hat der Mensch in Unkenntnis das ExCV weltweit verbreitet und eine der gefährlichsten Citruskrankheiten überall in die Citrus-Anbaugebiete der Welt eingeführt.

2.5.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)

Die geographische Verbreitung der PSTV ist in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle Nr. 6: Gesicherte Fundorte für die Spindelknollensucht der Kartoffel

Kontinent	Literaturangabe
<u>1. Afrika</u>	-
<u>2. Amerika</u>	
Kanada	MAC LACHLAN 1960 (105)
USA	
- Nebraska	GOSS 1928 (73)
<u>3. Asien</u>	
Sowjetunion	KLINKOWSKI 1968 (89)
<u>4. Australien</u>	BALD et al. 1941 (7)
<u>5. EUROPA</u>	
Bulgarien	KLINKOWSKI 1968 (89)
Polen	KLINKOWSKI 1968 (89)

Man kann daraus allerdings nicht eindeutig erkennen, daß die Hauptverbreitung in den USA und in Kanada liegt. Die Vorkommen in Australien, Europa und in der SU sind nur sporadisch und dürften bisher ohne große wirtschaftliche Bedeutung sein.

Epidemiologisch gesehen liegen die Voraussetzungen für die weltweite Verbreitung der Krankheit bei weitem nicht so günstig wie beim ExCV. Da die Verbreitung neuer Kartoffelsorten meist nicht in Massen über die Kontinente hinweggeht, sondern durch vielmehr bodenständige Züchtung und Vermehrung gekennzeichnet ist, kann die Ausbreitung meist nur lokal erfolgen.

Auch die Samenübertragbarkeit verstärkt diese Ausbreitung nicht, weil diese Vermehrungsart ohne praktische Bedeutung ist. Andererseits ist die Bedeutung des Umfangs und die Schnelligkeit der lokalen Ausbreitung durch Vektoren, Mensch und Maschinen noch zu wenig untersucht, als daß man hierüber endgültige Aussagen machen könnte.

2.6 Wirtschaftliche Bedeutung

2.6.1 Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)

Die Exocortis-Krankheit von Citrus ist eine weltweit verbreitete Krankheit, die in allen Citrus-Anbaugebieten auftritt. Wie man heute weiß wurde sie vor allem mit der bekannten Valencia-Orange verbreitet, da viele Mutterbäume dieser Sorte symptomlose Krankheitsträger waren. Dementsprechend ist die wirtschaftliche Bedeutung dieser Krankheit sehr groß, vor allem, da sie durch Spätschäden unschätzbare Verluste hervorrufen kann. Leider existieren noch keine exakten Schadensschätzungen aus den großen Citrusanbaugebieten der Welt. Es besteht jedoch Übereinstimmung, daß die Exocortis-Krankheit gegenwärtig eine der gefährlichsten Citrus-Krankheiten ist.

Die wirtschaftliche Bedeutung der Krankheit beruht in erster Linie auf der zum Teil sehr starken Verzweigung der Citrusbäume. So haben SLEETH (168) und NARIANI et al. (113) Citrusbäume experimentell mit ExCV infiziert und sie konnten nach 5 Jahren bereits ein auffälliges Zurückbleiben in ihrer Größe feststellen. Diese Wachstums-Depression kann durch zusätzlichen Virusbefall noch verstärkt werden. Es ist verständlich (CALAVAN et al. 30), daß ExCV-krankte Bäume durch das verzweigte Wachstum eine stark reduzierte fruchttragende Fläche besitzen, die einen beträchtlichen Ertragsverlust bedingt. Das zweite Merkmal der Krankheit, das für die wirtschaftliche Bedeutung wichtig ist, ist die lange Inkubationszeit, die nach FRAZER und LEVITT (62) zwischen 2 und 8 Jahren betragen kann. Diese Eigentümlichkeit bedingt auch die Gefährlichkeit der Krankheit, denn sie kommt somit erst dann zur Ausprägung, wenn die Citrusbäume ihre ersten Erträge bringen.

Während genaue Ermittlungen zum Ertragsausfall durch das ExCV fehlen, gibt es verlässliche Untersuchungen über

den Befallsgrad in einigen Anbaugebieten. So ist die Exocortis-Krankheit in Florida (USA) nach CHILDS und KNORR (32) in 50 % der Bäume vorhanden und GARNSEY und WHIDDEN (69) geben für verschiedene Citrus-Spezies und -Sorten in Californien einen Befall von 20-70 % an. Aus einer Arbeit von ROISTACHER et al. (130) geht schließlich hervor, daß zwischen 1954 und 1966 in den USA 138 neue Einführungen von Citrus angemeldet wurden, von denen 70 % viruskrank waren, darunter befand sich natürlich auch das ExCV. Für die Türkei hat ÖZALP und AZERI (120) für das ExCV einen Befall von 10 % gemeldet und in Sizilien wurden von CATARA (31) sogar rund 85 % der getesteten Bäume als krank ermittelt. Diese Ziffern sind erstaunlich hoch, wenn man bedenkt, daß sie aus Ländern stammen, die hervorragende Quarantänemaßnahmen durchführen.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß das ExCV vor allem in der Zukunft noch größere Bedeutung erlangen wird, da mit der Verbesserung des Nachweises sicher eine noch größere Befallszahl ermittelt werden wird. Dementsprechend werden dann auch noch intensivere Vorsorgemaßnahmen durchgeführt, die unter Umständen die Rodung ganzer Plantagen mit einschließen könnten.

2.6.2 Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)

Die Spindelknollensucht der Kartoffel ist in ihrer wirtschaftlichen Bedeutung nicht mit der Exocortis-Krankheit von Citrus zu vergleichen. Da die Symptome früher vorwiegend mit Dünge-Problemen oder Genetik-Faktoren in Beziehung gebracht wurden, herrscht naturgemäß noch weitgehend Unklarheit über die wirklichen Schäden.

Das Hauptsymptom der Spindelknollensucht, die Deformation der Kartoffelknollen verursacht gleichzeitig auch den größten Schaden. Die Spindelknollen mindern einerseits

den Ertrag (FERNOW, 60) und bringen andererseits durch die seltsame Form einen niedrigen Marktpreis (WERNER, 187). Eine zusätzliche Qualitäts-Minderung wird durch die geringe Lagerfestigkeit der kranken Kartoffelknollen verursacht (SCHULTZ und FOLSOM, 145). Und schließlich fand HOLMES (77), daß z. B. Kartoffeln der Sorte 'Jaco' rund 65 % Gewichtsverlust nach einer PSTV-Infektion zeigten. Es ist zu erwarten, daß durch die Entdeckung des Krankheitserregers jetzt eine intensivere Erforschung der Krankheit auch in der Praxis einsetzt. Da die Ermittlung der wirtschaftlichen Bedeutung gerade beginnt, kann man erwarten, daß erst in einigen Jahren die entsprechenden Daten zur Verfügung stehen werden.

2.7 Bekämpfung

Da beide Krankheiten durch jeweils spezifische Übertragungsweisen gekennzeichnet sind, erfordert ihre Bekämpfung unterschiedliche Maßnahmen, die getrennt behandelt werden sollen.

2.7.1 Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV)

Die wichtigste Maßnahme zur Bekämpfung der Exocortis-Krankheit ist die Verhinderung der Ausbreitung mit verseuchtem aber symptomfreien Pfropfmateri al. Die wichtigste Voraussetzung dafür ist die Gewinnung von garantiert ExCV-freien Mutterpflanzen, die als Ausgangsmateri al für den Neuaufbau von Citrus-Anlagen verwendet werden.

Daher haben bereits BENTON et al. (12, 13) vorgeschlagen, nur kontrollierte Pfropfknospen zu benutzen und als einzige Pfropf-Unterlage Poncirus trifoliata zu

verwenden, da diese Unterlage die Symptomausprägung unter allen Umständen erzwingt.

Im gleichen Sinne wird von SIBILIA (156) die Verwendung von sog. "nucellar clones" empfohlen, um so die Sicherheit zu haben, daß das Pfropfungsmaterial möglichst krankheitsfrei ist.

Alle diese Maßnahmen beruhen im Prinzip darauf, mit geeigneten Nachweismethoden das viroidfreie Ausgangsmaterial zu selektieren. Nachdem der biologische Test in der Vergangenheit ebenso unsicher wie langwierig war, wurde versucht, mit biochemischen Testmethoden das "Screening" sicherer zu gestalten. So entwickelten FELDMAN et al. (59) eine chromatographische Methode, um einen ExCV-Befall zu erkennen, die sich in der Praxis aber nicht durchgesetzt hat. Mit dem Auffinden der krautigen Testpflanze Gynura aurantiaca wurde vor einigen Jahren zwar ein schnell und sicher reagierendes System gefunden. Aber auch hier bestehen noch Schwierigkeiten, denn die Übertragung des ExCV von Citrus auf Gynura gelingt nicht immer, so daß eine relativ große Fehlerquote bestehen bleibt, der durch mehrfache Testung Rechnung getragen werden muß. Daß in diesem Bereich die Quarantänemaßnahmen sehr wichtig sind, braucht wohl nicht besonders betont zu werden.

Neben dieser primären Maßnahme ist es natürlich auch erforderlich, die Ausbreitung der Krankheit im Bestand unter allen Umständen zu verhindern. Da das ExCV mit den Schneidwerkzeugen (z. B. Scheren, Messern und Sägen) auf mechanischem Weg von kranken auf gesunde Bäume übertragen werden kann, ist es erforderlich, diese Geräte nach der Benutzung bei jedem Baum zu sterilisieren. Als Sterilisationslösung empfiehlt GARNSEY (70) eine Mischung von 2 %igem NaOH und 2 %igem Formaldehyd während ROISTACHER et al. (128, 139) vorschlagen, die Geräte

zuerst in eine 20 %ige Lösung von Natrium-hypochlorid (Eau de Javelle) und danach in eine 25 %ige Essiglösung zu tauchen, wobei die zweite Lösung die Korrosion der Geräte vermeiden soll. In beiden Fällen wird der Krankheitserreger sicher inaktiviert. Da bisher kein Vektor für das ExCV bekannt geworden ist, lassen sich in dieser Richtung keine spezifischen Maßnahmen empfehlen. Andererseits kann man davon ausgehen, daß die für die konventionellen Viruserkrankheiten üblichen Routine-Maßnahmen auch die denkbaren potentiellen ExCV-Vektoren mit erfassen.

2.7.2. Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV)

Diese Krankheit kann im Feld sowohl auf mechanischem Weg als auch durch Insekten-Vektoren übertragen werden. Diese beiden Übertragungswege erschweren eine sichere Bekämpfung. Die schnelle Verbreitung der Krankheit im Bestand geschieht wohl hauptsächlich auf mechanischem Weg während der Bearbeitung z. B. mit dem Pflug und mit Spritzgeräten. Hierbei tritt durch die mechanische Verletzung der Stengel und Blätter infektiöser Blattsaft aus dem Gewebe, der als Inokulum für die mechanische Weiterübertragung auf gesunde Pflanzen dient. Das geschieht in der Weise, daß solcher Gewebesaft an exponierten Geräte-Teilen (z.B. am Gestänge und an Rädern) haftet und beim Entlangfahren in der Reihe an andere Pflanzen verschmiert wird. Durch die bei diesem Vorgang geschaffenen zum Teil mikrofeinen Wunden kann dann die mechanische Übertragung des PSTV erfolgen. Auf die prinzipiell gleiche Weise ist sogar eine Übertragung von Pflanze zu Pflanze durch bloßen Blattkontakt und mechanisches Aneinanderreiben durch Windbewegung möglich. Aus dieser Beschreibung kann man die Schwierigkeiten erkennen, die einer wirksamen Verhinderung gerade dieses ungewöhnlichen

Ausbreitungsweges praktisch im Wege stehen. Es wären hier vorwiegend der Pflanzen- und der Reihen-Abstand zu vergrößern, beides Maßnahmen, die nicht praktikabel sind und deren Wert erst noch untersucht werden müßte.

Im Vergleich dazu ist die Bekämpfung der Insekten-Vektoren relativ einfach, zumal sie durch den Einsatz von Insektiziden zur Bekämpfung der Vektoren konventioneller Kartoffelviren in den meisten Fällen wohl mit erfaßt werden.

Die Samenübertragbarkeit des PSTV bringt schließlich ganz spezielle Probleme für die Kartoffelzucht mit sich (HUNTER et al. 79) und verlangt ein intensives "Screening" durch biologische Tests, um ein garantiert gesundes Zuchtmaterial zu erhalten. Hierbei wäre besonders auf symptom schwache und symptomlose Stämme des PSTV zu achten, die z. B. bisher nur auf der Tomatensorte "Allerfrüheste Freiland" entdeckt werden konnten (SINGH 158). Die Gewinnung von PSTV-freiem Zuchtmaterial aus verseuchten Klonen ist mit Hilfe der Wärme-Therapie und der Meristem-Kultur möglich (STACE-SMITH und MELLOR, 170).

3. MATERIAL UND METHODEN

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe Pflanzenvirologie, im Rahmen des Instituts für Phytopathologie der Justus Liebig-Universität in Gießen in der Zeit von Februar 1972 bis März 1974 durchgeführt.

3.1 Viroidherkünfte

Die untersuchten Viroide und ihre Herkunft sind in Tabelle Nr. 7. aufgeführt.

Tabelle Nr. 7: Die untersuchten Viroidkrankheiten und ihre Herkünfte

Viroid	Wirtspflanze	Haupttestpflanze	Herkunft
ExCV	Citrus	Gynura aurantiaca	Dr. L. Weathers, Davis, Calif., USA
PSTV	Kartoffel	Tomate, Sorte 'Rutgers'	Dr. T.O. Die- ner, Belts- ville USA

3.2 Anzucht der Versuchspflanzen

Alle für die Versuche verwendeten Pflanzen wurden im Gewächshaus unter praxisüblichen Bedingungen angezogen. Als Kultursubstrat diente ein Gemisch aus Torf, Sand und kompostiertem Klärschlamm. Die Pflanzen wurden in Kunststofföpfen (10 cm Durchmesser) eingetopft, durch regelmäßiges Spritzen und Räuchern schädlingsfrei gehalten, entsprechend den Anforderungen gedüngt und in einem jeweils für die Versuche geeigneten Zustand benutzt. Für alle Versuche wurden nur ausgesuchte Gruppen von gleichgroßen Pflanzen verwendet.

3.3 Testverfahren

3.3.1 Inokulation von Exoortis auf Gynura

Zur Inokulation von ExCV auf Gynura (144) wurde ein spezielles Werkzeug, das sog. "Fakirbett" benutzt. Dieses "Fakirbett" besteht aus einem rechteckigen Kunststoffgriff (8,0 x 1,8 x 0,9 cm), der an einem Ende 21 Nadeln trägt, die in drei Reihen mit je sieben Nadeln angeordnet sind. Jede einzelne Stahlnadel ist 2 cm lang und hat einen Durchmesser von 0,5 mm. Zur Applikation der zu inokulierenden Probe wird der Stengel der Gynurapflanze leicht mit Papier abgerieben, um die dichte Behaarung zu beseitigen. Anschließend wird die Probe mit einer Pasteurpipette auf ungefähr eine Länge von 5 bis 8 cm tropfenweise aufgetragen. Darauf erfolgen die Einstiche, die mit einer schnellen und leichten Handgelenkbewegung dreimal über die gesamte Inokulationsfläche ausgeführt werden. Das ergibt im Durchschnitt etwa 250 bis 350 mikrofeine Einstiche pro Pflanze. Die Tiefe des Einstiches ist ungefähr 5 mm. Sofort nach der Inokulation wird der inokulierte Pflanzenstengel mit Leitungswasser abgewaschen, um das restliche Inokulum zu beseitigen.

3.3.2 Inokulation von PSTV auf Tomate

Zur Inokulation von PSTV auf Tomate wird ein Glasspatel benutzt. Dieser Glasspatel besitzt einen Glasgriff (12 cm lang, Durchmesser 0,5 cm) der an einem Ende eine etwa pfenniggroße Scheibe trägt (15 mm Durchmesser) die zum Verreiben dient. Bevor man die Pflanze mit dem Glasspatel abreibt, wird Karborundum (Partikelgröße 320 Mikron) auf die Kotyledonen und Tomatenblätter gestäubt. Das Inokulum wird dann mit dem Glasspatel aufgenommen und vorsichtig und leicht auf der Blattoberfläche abgerieben. Nach der Inokulation wird jede Pflanze sorg-

fältig mit fließendem Wasser abgespült, um die Karborund- und Inokulum-Reste zu beseitigen.

3.4 Viroidvermehrung

Als Ausgangsmaterial diente jeweils eine tiefgefrorene Stammprobe von erkrankten Blättern, die zur ersten Vermehrung auf einige Pflanzen diente. Nach dem Auftreten deutlicher Symptome wurden Blätter geerntet für weitere Versuche. Im Falle von ExCV, das auf *Gynura aurantiaca* vermehrt wurde, dauerte diese Symptomausprägungszeit 4 bis 8 Wochen. Die Vermehrung von PSTV wurde auf der Tomatensorte 'Rutgers' durchgeführt, wo das Erscheinen deutlicher Symptome meist 2 bis 3 Wochen Zeit in Anspruch nahm. Das Inokulum zur Vermehrung wurde durch Homogenisation des Ausgangsmaterials in Tris-Phosphat (TP-) Puffer pH 8,0 hergestellt und ohne weitere Vorbehandlung direkt zur Infektion benutzt.

3.5 Bestimmungen der Physikalischen Eigenschaften

Zur Charakterisierung von Pflanzenviroiden ist es vor allem wichtig, auch die physikalischen Eigenschaften zu bestimmen.

3.5.1 Verdünnungsendpunkt

Als Ausgangsmaterial wurden kranke Tomaten- bzw. *Gynura*-Blätter (pro Versuchsglied 1 g Blattmaterial) verwendet. Diese Proben wurden zusammen mit 3 ml eines 0,1 molaren Tris-Phosphatpuffers pH 8,0 homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend durch Mull filtriert und davon ausgehend wurde eine 10-faktorielle Verdünnungsreihe mit demselben Puffer von 1:10 bis 1:100.000 hergestellt. Die

einzelnen Verdünnungsstufen wurden im Infektionstest getestet. Pro Versuchsglied wurden im Falle des Testes von ExCV-Proben je 5 Gynura und bei PSTV-Proben je 10 Tomaten verwendet.

3.5.2 Die Beständigkeit in vitro bei +4°C

Die Beständigkeit der Infektiosität bei +4°C wurde mit viroidhaltigem Pflanzenrohsaft festgestellt, der in derselben Weise wie für die Bestimmung des Verdünnungsendpunktes gewonnen wurde. Ausgehend von einer Stammprobe wurde zu diesem Zweck eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:500 und 1:1.000 mit TP Puffer pH 8,0 hergestellt. und danach in Reagenzgläschen verteilt. Röhrchen wurden auf Eis gestellt und in Zeitabständen herausgenommen, um Infektionslösung für die Testpflanzen zu entnehmen. Die Infektiosität wurde jeweils in Abständen von 10 Minuten getestet; der Versuch wurde nach 180 Minuten beendet.

3.6 Viroidreinigung

Zur Reinigung des PSTV bzw. ExCV wurde eine Standard-Phenolextraktionsmethode des Labors benutzt, die eine Kombination der Methoden von SÄNGER (140), SÄNGER u. BRANDENBURG (141), SEMANCIK u. WEATHERS (150) und FRAENKEL-CONRAT et al. (55a) darstellt. Da sich diese Methode für die Isolation von infektiöser Viroid-RNS als geeignet erwiesen hat, soll sie im folgenden genauer beschrieben werden.

3.6.1 Viroidreinigungsmethode nach SÄNGER

Die Extraktion von Gesamt-Nukleinsäure wird aus tiefgefrorenem gepulvertem Pflanzenmaterial (200 g) gestartet. Man fügt den Blättern zuerst 400 ml einer Phenolmischung

zu, die aus 80 Vol% Phenol, 20 Vol% TEMS-Puffer und 1 Gew.% 8-Hydroxychinolin besteht.

Weiterhin werden 10 g SDS (Na-Dodecylsulfat), 1 ml Silikon-Antischaum-Emulsion und 400 ml eines 0,1 molaren TEMS-Puffer dazugegeben.

Dieses Gemisch wird insgesamt 5 mal in einem großen Messer-Homogenisator (Waring-Blender) homogenisiert. Anschließend werden 50 ml einer 1 %igen Bentonit-Stammlösung zugefügt und die Homogenisation wird dann ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wird das Homogenisat für 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute (UPM) zentrifugiert. Dabei erhält man eine Auftrennung des Homogenisats in 3 Phasen: eine untere Phenol-Phase, eine mittlere Phase der Zell- und Gewebetrümmer und eine obere wässrige Phase, welche im wesentlichen die Nukleinsäuren enthält. Dieser wässrige Überstand wird vorsichtig abgenommen und noch zweimal phenolisiert. Der durch Zentrifugation geklärte letzte wässrige Überstand wird mit 2 Volumen Äthanol versetzt und bei -20°C über Nacht aufbewahrt. Während dieser Zeit fallen die Nukleinsäuren als Präzipitat aus.

Es erscheint angebracht, hier kurz die Funktionen der einzelnen Substanzen für diese Reinigungsmethode zu erklären:

Das Phenol dient als Lösungs- und Denaturierungsmittel für Proteine, während die Nukleinsäuren im wässrigen Überstand gelöst werden, der nach der Zentrifugation des Homogenisats entsteht. Das 8-Hydroxychinolin hilft, die Oxydation von Phenol durch Luftzutritt im Extrakt zu unterbinden. Natrium-Dodecylsulfat ist ein anionisches Detergen, das zum "Aufbrechen" von Protein-Nukleinsäure-Komplexen dient.

Das TEMS-Puffer-System besteht aus 0,1 molarem Tris (hydroxymethyl)-aminomethan als Base und HCl (bei der

pH-Einstellung benutzt) als Säure. 0,01 molares NA-EDTA ist das Na-Salz der Äthylendinitrilo-essigsäure und ein Komplexbildner mit der Eigenschaft, zweiwertige Kationen (Mg^{++} , Ca^{++}) zu binden. Diese zweiwertigen Kationen verstärken die nachteilige Wirkung von Nukleasen und führen außerdem zur Aggregation von Nukleinsäuren; 1 Vol% Mercapto-äthanol dient als Reduktionsmittel und verhindert die Braunfärbung des Extraktes durch Oxydation (= Polyphenolbildung). 0,1 molares NaCl garantiert ein geeignetes "Ionen-Milieu" und sorgt dafür, daß die Nukleinsäuren als Na-Salze vorliegen.

Die Weiterbearbeitung des Nukleinsäure-Präzipitats kann erfolgen, nachdem es in ein kompaktes Sediment zentrifugiert wurde. Dieses Sediment wird in 0,025 molarem TES-Puffer gelöst und diese ebenfalls durch Zentrifugation geklärte Lösung wird der sog. "Kirby-Behandlung" unterzogen, bei der aus der Gesamt-Nukleinsäure-Probe die Polysaccharide entfernt werden sollen. Dazu wird der Nukleinsäure-Lösung das gleiche Volumen einer 2,5 molaren K_2HPO_4 -Lösung pH 8,3 und das gleiche Volumen von 2-Methoxyäthanol zugesetzt. Diese Mischung einer wässrigen Lösung und eines organischen Lösungsmittels ergibt ein 2 Phasen-System, nachdem sie 2 Minuten kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert wird. In der oberen wässrigen Phase sind die Nukleinsäuren enthalten, während sich die unerwünschten Polysaccharide in der unteren organischen Phase gelöst befinden oder sich zwischen beiden Phasen als dünner Film ansammeln: Die obere Phase wird vorsichtig abgenommen und mit Na-acetat versetzt (pro 100 ml obere Phase je 1,4 g Na-acetat). Anschließend werden die Nukleinsäuren durch Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Zugabe ausgefällt und durch Zentrifugation als Sedimente gewonnen.

Zur Umwandlung der unlöslichen CTAB-RNS in das lösliche Na-Salz

wird das Sediment mehrfach mit 70 %igem Alkohol gewaschen, der 0,1 M Na-Acetat enthält. Das endgültige RNS-Sediment wird durch Zentrifugation möglichst vollständig von Alkohol befreit und anschließend mit Äther gewaschen und im Exsikkator kurz im Vakuum getrocknet.

Aus dieser partiell gereinigten Nukleinsäure-Probe wird die Viroid-RNS zusammen mit der Transfer-RNS, der 5s-RNS und der DNS durch Lösen in 2 molarer Lithiumchlorid-Lösung gewonnen. Dabei bleibt die ribosomale RNS als unlösliches Material zurück, während sich die sog. lösliche RNS nach der Zentrifugation der trüben Suspension im klaren Überstand befindet. Aus diesem Überstand kann die RNS mit dem doppelten Volumen Äthanol ausgefällt und somit zum Schluß in einem Sediment konzentriert erhalten werden. Dieses Sediment wird in Puffer gelöst und stellt die Endprobe der sehr aufwendigen Reinigungsmethode dar, welche die Viroid-RNS angereichert enthält.

3.7 Disk-Elektrophorese

Die Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese (MAURER, 101) ist eine Methode zur Auftrennung von Substanzgemischen. Sie kombiniert die elektrophoretische Beweglichkeit von Molekülen mit einem Konzentrierungs- und Molekularsieb-Effekt und ist durch besondere Trennschärfe im Mikro- und Submikro-Bereich charakterisiert. Dieses Trennvermögen beruht auf der Eignung von Polyacrylamid-Gelen als Molekularsiebe und als Elektrophorese-Träger.

Das Polyacrylamid-Gel selbst ist ein Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid und N,N'-Methylenbisacrylsäureamid als Vernetzer.

Acrylsäureamid (DETERMAN, 52 ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) ist eine wasserlösliche Substanz, die eine reaktive Doppelbindung enthält. Man kann sie unter milden Bedingungen zur Polymerisation anregen, wobei das lösliche Polyacrylamid entsteht. Fügt man dem Ansatz zuvor aber ein bifunktionelles Acrylamid N,N-Methylen-bisacrylamid ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$) zu, dann erhält man bei der Polymerisation in wässriger Lösung ein unlösliches Gel. Das Polymer wird durch die gleichzeitige Anwesenheit des bifunktionellen Reagenz in zwei verschiedenen Ketten zusammengehalten. So entsteht ein dreidimensionales Netzwerk aus Kohlenstoffketten, wobei die an jedem zweiten Kohlenstoffatom befindliche Carbonsäureamid-Gruppe die Polarität und damit die Quellbarkeit in Wasser bedingt.

Die für den Molekularsieb-Effekt wichtige Porengröße im fertigen Gel wird wieder vornehmlich durch die Gesamtkonzentration der Monomeren im Ansatz reguliert und erst in zweiter Linie durch den Prozentsatz an bifunktionellen Monomeren bestimmt. Nach HJERTEN (76) kann man so durch Variation der Gesamtkonzentration an Monomeren zwischen 4 und 16 % und bei konstantem Vernetzergehalt von 5 % des Monomer-Anteils Gelen mit abgestufter Porengröße und Quellfähigkeit erhalten. Zur Fraktionierung der Nukleinsäure-Lösungen auf Polyacrylamid-Gelen wurde das Verfahren nach LOENING und LOENING & INGLE (193, 99) angewendet.

3.7.1 Apparative Ausrüstung und Methodik

Zur Trennung wurden zylindrische Plexiglas-Röhrchen von 15 cm Länge und mit einem inneren Durchmesser von 5 mm verwendet. Die Röhrchen werden mit Laborspülmittel (Deconex) gereinigt, anschließend gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Zum Füllen der Röhrchen mit der Gelflüssigkeit wurden sie am unteren Ende mit Kunststoffstopfen verschlossen.

Die Elektrophorese wurde in einer der üblichen Apparaturen aus Plexiglas durchgeführt, wobei meist 10 Röhrchen gleichzeitig verwendet wurden.

Als Stromquelle diente ein handelsübliches stabilisiertes elektrisches Netzgerät (Fabrikat Camac), mit dem die Gel-Läufe routinemäßig bei 5 mA pro Gel durchgeführt wurden.

Nach dem Lauf wurden die Gele aus ihren Röhrchen entfernt und in einer Quarzglasküvette in der Gel-Meßvorrichtung eines Spektralphotometers (Gilford 240) bei 260 nm gemessen und registriert. Auf diese Weise läßt sich die erfolgte Auftrennung des Nukleinsäure-Gemisches klar erkennen. Die Lokalisation des infektiösen Viroid-RNS geschieht über den Infektiositäts-Test. Dazu werden die Gele nach der Messung direkt oder in eingefrorenem Zustand in Gel-Scheibchen von 1 mm Länge fraktioniert, die getrennt voneinander in Plastik-Röhrchen tiefgefroren aufbewahrt werden. Zur Elution der Nukleinsäure werden die Gel-Scheibchen mit Pufferlösung übergossen und unter gelegentlichem Schütteln für 12 - 18 Stunden bei +4°C aufbewahrt. Diese Elutionsflüssigkeit kann entweder direkt oder nach entsprechender Verdünnung als Inokulum zum Infektiositätstest benutzt werden.

3.8 Säulenchromatographie

Die Versuche zur säulenchromatographischen Fraktionierung isolierter Gesamt-RNS aus Viroid-infiziertem Pflanzengewebe wurde mit Bio-Gel P-200 der Bio-RAD-Laboratorien durchgeführt. Es handelt sich bei diesem Material um biologisch inerte, sphärische Polyacrylamid-Partikel mit relativ eng begrenztem Porendurchmesser. Bio-Gel P ist in seinen chromatographischen Eigenschaften dem Sephadex-Gel prinzipiell vergleichbar. Allerdings ist das Bio-Gel P als Polyacrylamid ein synthetisches Polymer während

Sephadex als Dextran ein biogenes Polysaccharid darstellt.

Zur Chromatographie wurden Glas-Säulen von 22 mm Durchmesser und 1 Meter Länge verwendet. Als Elutionsflüssigkeit diente eine 0,05 molare KCl-Lösung, die zur Vermeidung von Mikroorganismen-Wachstum 1 % Methanol enthielt. Zur Fraktionierung diente ein Ultro-Rac der Firma LKB und die optische Dichte des Säuleneluats wurde bei 254 nm (als Transmission) im Uvicord der gleichen Firma gemessen. Die Probe wurde in 2-3 ml auf die Säule aufgetragen mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 18-20 ml pro Stunde durch die Säule gegeben und in Fraktionen von 5 ml gesammelt. Als Marker-Substanzen dienten 4s- und 5s-RNS, die elektrophoretisch vorgereinigt worden waren. Das chromatographische Verhalten der Viroid-RNS wurde indirekt über den Infektiositäts-Test ermittelt.

3.9 Zusätze zur Inokulationslösung

Als Zusätze zur Erhöhung des Infektionserfolgs wurden DEAE (Diäthylaminoäthyl-Dextran) und Dimethylsulfoxyd (DMSO) als Zusätze zur Pufferlösung (0,1 M Tris-Phosphat-Puffer pH 8,5) gegeben, wobei Konzentrationen von 0,1 %, 1,0 %, 5,0 % oder 10,0 % verwendet wurden. 1 g kranke Gynura- bzw. Tomatenblätter wurden mit 3 ml dieser Lösung in einem Mörser zermörsert. Dieses Homogenisat wurde durch Mull filtriert und zur Inokulation mit der gleichen Lösung verdünnt (1:10, 1:100, 1:1000).

3.10 Test zur Suche neuer Wirtspflanzen für das ExCV und PSTV

Einer der wichtigen Fragestellungen dieser Arbeit war es zu versuchen, bessere und einfachere Testpflanzen zum

biologischen Nachweis der Erreger beider Krankheiten zu finden. Dazu wurden vorwiegend Pflanzen ausgewählt, die möglichst einfach anzuziehen sind, die schnell wachsen, und die möglichst unbehaarte Blätter mit einer relativ großen Blattoberfläche zur Aufnahme des Inokulums besitzen. Außerdem sollten sie natürlich schnell und sicher deutliche Symptome entwickeln. Eine ideale Testpflanze sollte möglichst mit Lokalläsionen reagieren, um einen quantitativ auswertbaren biologischen Test zu ermöglichen.

Die einzelnen Testpflanzen wurden im Gewächshaus auf die übliche Weise angezogen und in Plastik-Töpfen aufgestellt. Ihre Verwendung zum Test wurde von den jeweils spezifischen Wachstums-Verhältnissen und dem Eignungszustand bestimmt.

Die Inokulation erfolgte in erster Linie durch die mechanische Abreibung geeigneter Blätter unter Verwendung von Karborund, zumal bei dieser relativ einfachen Methode gleichzeitig geeignete Lokalläsionen-Wirte mit erfaßt werden sollten.

In allen Fällen, in denen es möglich war, Pflanzen mit geeigneten Stengeln heranzuziehen, wurde außerdem die Inokulation durch Stengelpunktur mit dem "Fakirbett" angewendet, um so möglicherweise geeignete Testpflanzen für das ExCV mitzuerfassen. Die inokulierten Pflanzen wurden wenigstens 4 Wochen zur Symptomausprägung stehen gelassen. Der Erfolg der Infektion, d. h. die Viroid-Vermehrung in den verschiedenen Pflanzen wurde durch den Rücktest auf die sicher mit Symptomen reagierenden Standard-Testpflanzen Gynura und Rutgers-Tomaten festgestellt.

3.11 Test zur Bestimmung der Latenzzeit des ExCV und des PSTV

Da keine Daten über die Latenzzeit der Viroide vorlagen, wurde versucht, durch biologische Tests den Zeitpunkt herauszufinden, bei dem diese Krankheitserreger zum ersten Mal in der inokulierten Pflanze nachzuweisen sind.

3.11.1 Die Bestimmung der Latenzzeit des ExCV bei Gynura

Die Bestimmung der Latenzzeit für das ExCV erfolgte bei infizierten Gynurapflanzen, deren Infektiosität wiederum auf Gynura getestet wurde. Dazu wurden 200 gleichgroße Ausgangs-Pflanzen zu einem gemeinsamen Zeitpunkt nach der Standard-Methode mit dem Fakirbett inokuliert. Von je 5 dieser inokulierten Gynura wurde in Abständen von je 1 Tag bis zum 14. Tag nach der Inokulation eine Blatt-Mischprobe mit TP-Puffer zermörsert, durch Mull filtriert und anschließend zur Feststellung der Infektiosität auf 5 gesunde Gynurapflanzen inokuliert.

Daran anschließend wurden die Proben nur noch in Abständen von je 2 Tagen bis zum 48. Tag nach der Inokulation entnommen und getestet. Zu diesem Zeitpunkt waren klare Symptome bei allen Ausgangspflanzen aufgetreten, so daß der Versuch für beendet erklärt werden konnte.

Die relative Infektiosität der getesteten Blatt-Mischproben wurde aus dem Infektionserfolg ermittelt, der die entsprechenden Blatt-Homogenisate 40 Tage nach dem Test durch Symptome am Haupttrieb ergaben.

Im Laufe der Untersuchungen hatte sich nämlich herausgestellt, daß nach einem Rückschnitt der Gynurapflanze bis kurz oberhalb der Inokulations-Region in vielen Fällen der Neu-Austrieb trotz ursprünglicher Symptomfreiheit der Pflanze Krankheitssymptome zeigt. Dieses Verfahren erlaubt demnach eine Verfeinerung des biologischen Tests in der Weise, daß selbst noch geringe ExCV-Konzentrationen

nachgewiesen werden können. Deshalb wurde nach dem Rückschnitt eine zweite Bonitur 60 Tage nach der Inokulation durchgeführt, mit der geringe Viroidkonzentrationen und damit gleichzeitig eine genauere Latenzzeit festgestellt werden konnten. Es ist dabei selbstverständlich, daß der Rückschnitt jeder einzelnen Pflanze zur Vermeidung von unbeabsichtigten Viroid-Übertragungen mit je einer sterilen Rasierklinge erfolgte.

3.11.2 Bestimmung der Latenzzeit für das PSTV in Tomate

Diese Versuchsreihe wurde mit 100 Tomatenpflanzen (Sorte 'Rutgers') angesetzt, die zum Zeitpunkt der Blatt-Inokulation mit Karborund 2 Kotyledonen und nur ein echtes Blatt besaßen.

Anschließend an die Inokulation wurden im Abstand von je einem Tag jeweils 8 dieser infizierten Tomaten randomisiert entnommen und als Mischprobe zur Inokulation von wiederum 8 Rutgers-Tomaten verwendet, die dann im Falle einer geglückten Infektion nach 30 Tagen mit den Primärsymptomen der Epinastie reagierten. Ähnlich wie bei dem ExCV-Gynura-System führt die Dekapitation der Tomate zu einer Symptomverstärkung, so daß man 45 Tage nach der Inokulation eine sichere Bonitur durchführen kann. Der Rückschnitt der Tomaten erfolgte jeweils mit sterilen Rasierklingen unter Berücksichtigung der potentiellen Gefahr einer unbeabsichtigten mechanischen Übertragung des PSTV während aller Manipulationen.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSTON

4.1 Mechanische Übertragung von Exocortis auf Gynura

4.1.1 Die Fakirbett-Inokulation

Die Übertragung des infektiösen Agens von ExCV auf *Gynura aurantiaca* gelang zuerst WEATHERS und GREER (180) durch einfache Nadelstiche (needle puncture) oder durch Schnittverletzungen mit Skalpelln oder Rasierklingen (slash inoculation) des Stengels.

Im Verlauf der Untersuchungen der Arbeitsgruppe Pflanzen-virologie in Gießen (SÄNGER et al., 144; noch unveröffentlicht) hatte sich gezeigt, daß unter den örtlichen Bedingungen mit diesen Methoden nur eine sehr geringe Übertragungsrate zu erzielen ist. Daher wurde eine verbesserte Nadel-Stich-Inokulation entwickelt, bei der mit einem einzigen Einstich gleichzeitig 21 Nadelstiche die Testlösung in den Pflanzenstengel inokulierten. Diese sogenannte "Fakirbett-Inokulation" erwies sich als eine sehr brauchbare Methode mit der in Gießen zum ersten Mal reproduzierbare Ergebnisse auch bei Routine-Versuchen erreicht wurden. Ausgehend von diesen vorliegenden Ergebnissen sollten daher die wichtigsten Inokulationstechniken vergleichend untersucht werden, um so die Grundlagen für einen reproduzierbaren Infektions-Test zu erarbeiten.

Die Details der Fakirbett-Inokulationsmethode sind unter Material und Methode detailliert beschrieben. Der Vorteil dieser Methode beruht darauf, daß sie sehr gut reproduzierbar ist und falls sie richtig durchgeführt wird, nur zu einer sehr geringen Schädigung der Pflanze führt, soweit dies am Auftreten von Welkesymptomen, Nekrosen und Absterbeerscheinungen zu beurteilen ist.

4.1.2 Die Beziehungen zwischen der Zahl und der Tiefe der Inokulations-Einstiche und dem Infektionserfolg

Da mit einem Einstich des "Fakirbetts" 21 Stahlnadeln in das Stengelgewebe eindringen und gleichzeitig ein größeres Areal des Stengels so behandelt wird, wurde als erstes der Einfluß der Einstichtiefe und der Anzahl der Einstiche auf der gleichen Stelle auf den Infektionserfolg getestet. Das Ergebnis einer solchen Versuchsreihe ist in Abbildung 6 dargestellt. Es zeigt sich, daß die optimale Anzahl der Einstiche mit dem "Fakirbett" 3 oder 4 Stiche an der gleichen Stelle ist. Auf diese Weise erhält man einen guten Infektionserfolg bei einer relativ geringen Schädigung der Pflanze durch die Stichverletzung. Außerdem führt dies zu einer sehr schnellen Erholung der Pflanze nach der Inokulation und das weitere Wachstum ist nur unwesentlich beeinträchtigt. Man kann zwar aus der Abbildung entnehmen, daß mit zunehmender Zahl von Einstichen ein überdurchschnittlicher Infektionserfolg zu erzielen ist, aber aus der Abbildung geht nicht hervor, daß dabei die Pflanzen so stark geschädigt werden, daß stets eine große Zahl der Versuchsglieder abstirbt und somit verloren geht.

Die Einstiche während der Inokulation führen auch aufgrund ihrer Intensität und Tiefe naturgemäß zu einer Zerstörung der Leitgefäße, so daß die Pflanzen unter Umständen so stark welken, daß sie sich nicht mehr erholen können und dann vertrocknen.

Was die Tiefe der Einstiche angeht, kann man aus Abb. 6 weiter entnehmen, daß bei den Inokulationsverdünnungen 1:10 und 1:100 die flachen, schräg eingesetzten Einstiche einen wesentlichen geringeren Infektionserfolg als die tiefen und senkrechten Stiche zeigen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß bei flachem Einstich die Tiefe kaum mehr als 2 mm beträgt, so daß die Infektionschance

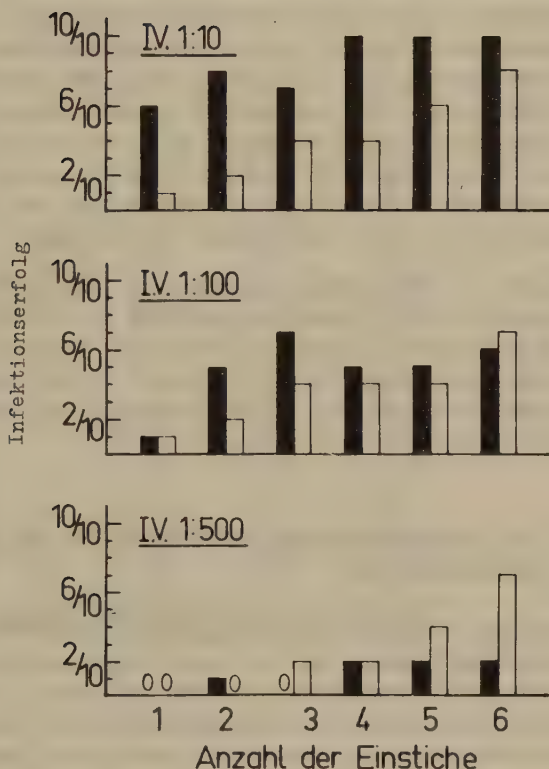


Abb. 6: Der Einfluß von Zahl und Art der Inokulations-Einstiche mit dem sog. "Fakirbett" auf den Infektionserfolg des ExCV auf *Gynura aurantiaca*. Die Infektiosität wird als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten Pflanzen angibt und der Nenner die Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen.

■ = Senkrechte Einstiche (ca. 5 mm tief).

□ = Flach-schiefe Einstiche (ca. 2 mm tief).

I.V. = Inokulum-Verdünnung.

für das ExCV offensichtlich stark vermindert wird. Interessanterweise ist die flache Inokulationsweise bei hoher Verdünnung des Inokulums (1:500), also bei niedriger Viroidkonzentration den tiefen Einstichen dann überlegen, wenn 5 oder 6 mal eingestochen wird. Dieser geringe Vorteil sollte jedoch nicht überbewertet werden, weil unter normalen Bedingungen auch mit dieser Technik relativ starke Schäden gesetzt werden, so daß ein großer Teil des Testpflanzenmaterials durch Vertrocknen verloren geht.

Für die Praxis führen diese Ergebnisse zu dem Kompromiß, die Inokulation mit senkrechten und nicht zu tiefen Einstichen durchzuführen, wobei eine drei- bis vier-malige Inokulation der gleichen Stelle erfolgen sollte, damit die mechanische Verletzung der Pflanze möglichst geringfügig gehalten wird.

4.1.3 Die Beziehung zwischen dem Einstich-Ort und dem Infektionserfolg

Die krautige Testpflanze Gynura_aurantiaca wird durch Kopfstecklinge vermehrt und als eine eintriebige Pflanze angezogen, die je nach Alter eine Höhe zwischen 5 bis 30 cm haben kann, wenn sie für Infektiositätstests benutzt wird. Da die Pflanze nach der Bewurzelung sehr schnell wächst, verholzt der Stengel im unteren Teil rasch, während er nach der Triebspitze hin zunehmend krautig und schließlich saftig und weich wird. Aufgrund dieser Unterschiede im Stengelgewebe erschien es sinnvoll festzustellen, welche Beziehung zwischen dem Inokulationsort und dem Inokulationserfolg bei Gynura besteht. Für diesen Versuch wurde ein großes Sortiment homogener Pflanzen mit einer Länge von 20 cm ausgewählt. Der Stengel wurde in drei Abschnitte von je 6 cm Länge aufgeteilt, wobei die verholzten 2 cm am Stengel-

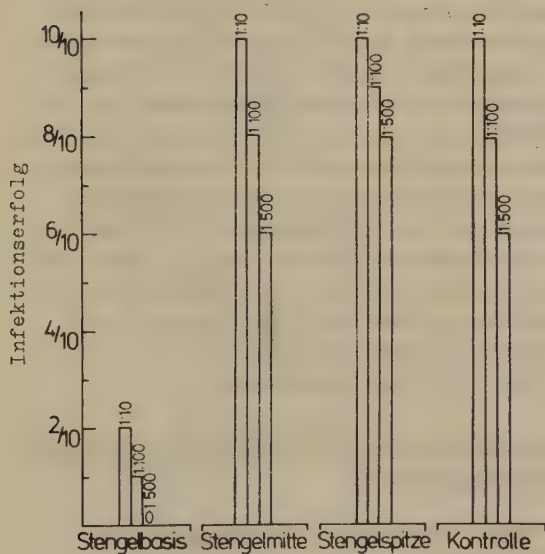


Abb. 7: Der Einfluß des Inokulations-Ortes auf den Erfolg der Infektion des ExCV mit dem "Fakirbett" auf Gynura_aurantiaca.

Kontrolle = Standard-Inokulation der Mittelregion des Stengels unter Schonung der weichen Spitzenregion.

grund unberücksichtigt blieben. Diese Pflanzen wurden dann jeweils in der unteren, mittleren und oberen Region mit dem "Fakirbett" infiziert. Das Ergebnis dieses Tests ist in Abbildung 7 dargestellt. Daraus ergibt sich, daß der beste Infektionserfolg dann erreicht wird, wenn die Inokulation im oberen Drittel des Stengels vorgenommen wird. Die Infektionsrate in der mittleren Region ist geringfügig schlechter, während die Inokulation an der verholzten Stengelbasis eine drastische Verminderung des Infektionserfolges bedingt. Für die praktische Anwendung ergibt sich daraus, daß man nur die obere Hälfte des Gynura-Stengels zur Infektion benutzen sollte, dabei muß aber unter allen Umständen das weiche Gewebe nahe der Stengelspitze geschont werden, da es sehr empfindlich gegenüber mechanischen Stichverletzungen ist und sehr leicht abbricht oder welkt und austrocknet.

4.1.4 Der Einfluß drei verschiedener Inokulationsmethoden auf den Infektionserfolg

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die dreimalige "Fakirbett-Inokulation" in der oberen Stengel-Hälfte unter Schonung der Spitzenregion eine optimale Infektionsrate ergibt, wurde diese Technik als Standardmethode benutzt. Um ihre Überlegenheit über die beiden älteren Techniken der "slash inoculation" noch einmal experimentell zu testen, wurden alle drei Methoden miteinander verglichen.

Bei der Skalpellstich-Inokulation wurden chirurgische Einmal-Skalpelle (Gillette Sabre Shape E/11) benutzt, die entweder 3 mm senkrecht oder 4 mm bis 5 mm flach, d. h. in einem Winkel von 45° durch die auf den Stengel aufgebrachte Inokulations-Lösung eingestochen wurden. Daneben wurde ein ca. 5 cm langer Längsschnitt am apikalen Stengelende durchgeführt, wobei die Inokulationslösung sofort anschließend in den Schnitt gegeben wurde. Der Vergleich aller drei Methoden ist in Abbildung 8 dargestellt. Es zeigt sich,

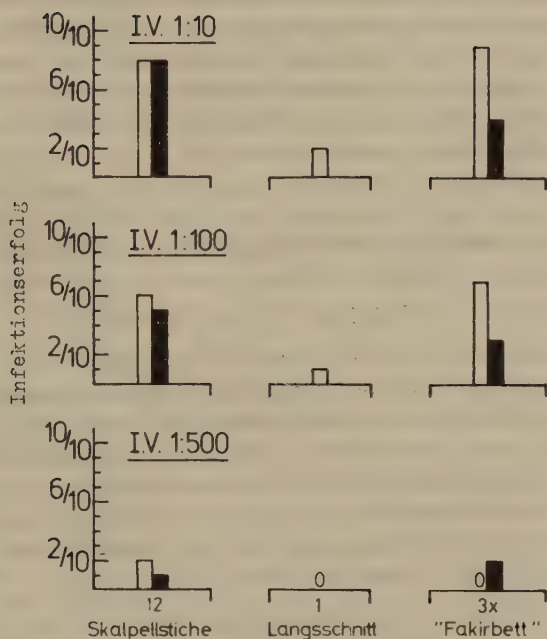


Abb. 8: Der Einfluß von drei verschiedenen Inokulationsmethoden auf den Infektionserfolg des ExCV auf *Gynura aurantiaca*. Die Infektiosität wird als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten Pflanzen und der Nenner die Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen angibt.

■ = Senkrechte Einstiche, ca. 5 mm tief.

□ = Flache Einstiche, ca. 2 mm tief.

I.V. = Inokulum-Verdünnung.

dabei, daß die Fakirbettinokulation in der Tat allen anderen Methoden überlegen ist. Zur Inokulationsmethode mit Skalpellsstichen ist zu bemerken, daß diese Technik relativ schwierig durchzuführen ist. Die Einstiche sind nur bedingt reproduzierbar durchzuführen, weil Schnittbreite und -tiefe schlecht kontrollierbar sind. Hinzu kommt als offensichtlicher Nachteil, daß diese Einstiche durch das Rindengewebe des Stengels sehr leicht eintrocknen und klaffen und darüber hinaus die Leitungsbahnen zur Stengelspitze mehrfach auf breiter Fläche trennen. Diese Art Verletzungen beeinträchtigt die mechanische Festigkeit der Stengel sehr stark, so daß gewöhnlich eine große Zahl von Pflanzen nach der Inokulation abbricht.

Was die Anzahl der Skalpellsstiche angeht, so läßt sich feststellen, daß sechs Stiche für einen akzeptablen Infektionserfolg nicht ausreichend sind. Zwölf Messereinstiche hingegen setzen bereits beträchtliche Verletzungen und vierundzwanzig Einstiche sind überhaupt nur flach und sehr vorsichtig durchführbar. In allen Fällen ist diese Technik im Vergleich zur "Fakirbett-Methode" viel zeitraubender und weniger gut reproduzierbar.

Die Inokulation durch einen Längsschnitt liefert keine befriedigende Ergebnisse und dürfte somit als Methode ausscheiden.

Betrachtet man alle diese Ergebnisse zusammenfassend, dann erweist sich die Fakirbett-Inokulation als die geeignetste Methode für die Übertragung des ExCV auf *Gynura* selbst unter den ungünstigsten Voraussetzungen einer sehr niedrigen Konzentration des infektiösen Agens. Diese Methode ist leicht erlernbar und nach relativ kurzer Zeit auch von ungeübtem Personal ohne große Schwierigkeiten in reproduzierbarer Weise durchzuführen. Aus den dargestellten Ergebnissen kann man weiterhin entnehmen, daß ein negativer Infektionserfolg bei der Inokulation mit

Längsschnitten nicht unbedingt die Abwesenheit von ExCV im zu testenden Gewebe bedeutet, weil bei sehr niedriger Viroidkonzentration diese Methode keine optimalen Ergebnisse liefert. Es empfiehlt sich daher vor allem bei der sehr oft erfolglosen Übertragung des ExCV von Citrus auf Gynura die "Fakirbett-Methode" zu benutzen, wodurch unter Umständen Infektionserfolge erreicht werden können.

4.2 Die Ermittlung krautiger Testpflanzen für das ExCV und das PSTV

Die Untersuchung der biologischen Eigenschaften des ExCV wurde erst möglich als es WEATHERS und GREER (180) gelang, in der Composite Gynura aurantiaca eine krautige Testpflanze zu finden. Vorher waren alle Untersuchungen in dieser Richtung nur sehr begrenzt möglich, weil das Arbeiten mit den holzigen Citruspflanzen viele Schwierigkeiten bot. Die Anzucht großer Mengen einheitlichen Materials ist langwierig und schwierig, der Raumbedarf ist sehr groß und schließlich ist der Infektionserfolg bei Citrus recht unsicher und das Auftreten der Symptome dauert Monate bis Jahre. Gynura hingegen wächst und reagiert schnell und sicher und die Notwendigkeit, diese Pflanze durch Kopfstecklinge zu vermehren, bereitet keine besonderen Probleme. Der einzige Nachteil, den dieses Testsystem im Vergleich mit denen konventioneller Pflanzen-Viren hat, ist das Fehlen einer Lokalläsionen-Reaktion. Da Gynura nur mit einer systemischen Infektion reagiert und so mit einer Alles-oder-Nichts-Reaktion im biologischen Test antwortet, ist es noch immer sehr schwierig, verlässliche quantitative Aussagen aus einem Infektiositäts-Test zu machen.

Beim PSTV waren die Verhältnisse im Prinzip ähnlich. Nachdem die Tomate von RAYMER und O'BRIEN (123) als ge-

eignete Testpflanze gefunden worden war, begannen die Untersuchungen über den Krankheitserreger mit größerer Intensität. Auch die Tomate reagiert mit einer systemischen Infektion und quantitativen Aussagen sind nur über Verdünnungsreihen und mit dem Einsatz sehr vieler Testpflanzen pro Versuchsglied möglich.

In beiden Fällen war es also angebracht, nach weiteren krautigen Wirtspflanzen zu suchen und dies jeweils im Rahmen einer Ermittlung des experimentellen Wirtspflanzenkreises zu tun. Dies geschah in der Erwartung, daß sich dabei unter Umständen einige bessere Testpflanzen finden lassen würden, die möglichst mit Lokalläsionen reagieren sollten.

Angesichts der Tatsache, daß in vielen Fällen symptomlose (latente) Infektionen auftreten könnten, war es erforderlich, von allen infizierten Pflanzen Rücktests auf Gynura bzw. Tomate, Sorte "Rutgers" zu machen, um eine gesicherte Aussage über die tatsächliche Situation der Viroidvermehrung in der jeweiligen Pflanzenart machen zu können. Dieses relativ aufwendige Verfahren nahm einen breiten Raum im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein.

Zur Inokulationstechnik für diese Versuche ist noch zu erwähnen, daß in allen Fällen mechanische Blatt-Inokulationen mit Karborundum durchgeführt wurden, weil das Auftreten von Lokalläsionen auf den Blättern als das wichtigste Kriterium für eine gute Testpflanze angesehen wird.

4.2.1 Der Wirtspflanzenkreis des ExCV

Die Ergebnisse der experimentellen Ermittlung des Wirtspflanzenkreises des ExCV sind in Tabelle Nr. 8 dargestellt. Man kann daraus entnehmen, daß von den 8 ge-

testeten Pflanzenfamilien in nur 2 Familien anfällige Pflanzenarten gefunden werden konnten. Allerdings reagierten keine dieser Arten mit Lokalläsionen auf den infizierten Blättern, sondern lediglich mit systemischer Infektion. Und zwar erwiesen sich die Solanaceen Scopolia lurida und Hyoscyamus niger nur als neue Wirtspflanzen. Allerdings war ihre systemische Reaktion auf die Infektion nicht so eindeutig, daß sie als ein geeigneter Ersatz für Gynura aurantiaca angesehen werden können. Die dritte Solanacee Physalis peruviana wurde bereits von WEATHERS et al. (181) als Wirtspflanze beschrieben. Überraschenderweise gelang es nicht, das ExCV auf Tomate zu übertragen, denn auf diese Weise hätte man eine gemeinsame Testpflanze für beide Viroide, das ExCV und das PSTV zur Verfügung gehabt. Dieses negative Ergebnis mit Tomaten steht im Widerspruch zu dem Bericht von SEMANCIK und WEATHERS (150), nach dem das ExCV offenbar ohne große Schwierigkeiten auf Tomate übertragen werden kann. Da beide Autoren die Inokulation mit hochkonzentriertem Material durchführten, wurde auch diese Möglichkeit der Übertragung mehrfach versucht, um so die Infektionschancen möglichst zu verbessern. Unter diesen Bedingungen ist es ebenfalls bisher nicht gelungen, bei rund 25 verschiedenen Tomatensorten eine Vermehrung des ExCV nachzuweisen. Selbst äußerlich verdächtige Pflanzen erwiesen sich im Rücktest auf Gynura als negativ.

Es ist nicht besonders überraschend, daß neben Solanaceen auch noch Compositen positiv auf eine ExCV-Infektion reagieren, denn Gynura, die Standard-Testpflanze, gehört bekanntlich zur gleichen Familie.

Als neue Testpflanzen daraus konnten Calendula officinalis und Guizotia abyssinica gefunden werden. Aber auch hier sind diese beiden neuen Vertreter sehr viel weniger geeignet als die Standard-Testpflanze Gynura.

Tab. 8: Ergebnis der Inokulation verschiedener krautiger Testpflanzen mit ExCV-haltigem Blatthomogenisat von Gynura. Der Infektionserfolg wurde beurteilt nach den auftretenden Primär- bzw. Sekundär-Symptomen und für den Fall symptomloser Infektionen nach dem Ergebnis des Rücktestes auf Gynura.

Pflanzenart		Primär-Inokulation		Rücktest auf Gynura	
		Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Mit Sympto- men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Erkrankt
I. Familie Solanaceae					
1	Datura stramonium	5	0	3	0
2	Datura stramonium	5	0	3	0
3	"	5	0	5	0
4	"	5	0	3	0
5	"	5	0	3	0
6	"	5	0	5	0
7	meteloides	5	0	5	0
8	metel var. fastuosa	5	0	5	0
9	inoxia	5	0	5	0
10	leichhardtii	5	0	5	0
11	Lycopersicon esculentum	5	0	5	0
12	"	5	4	5	0
13	"	5	0	5	0
14	"	5	0	5	0
15	"	5	0	5	0
16	"	5	2	5	0
17	"	5	1	5	0
18	"	5	0	5	0
19	"	5	0	5	0
20	"	5	0	5	0
21	"	5	0	5	0
22	"	5	0	5	0
23	"	5	0	5	0
24	"	5	0	5	0
25	"	5	0	5	0
26	"	5	0	3	0

Pflanzenart	Primär-Inokulation		Rücktest auf Gynura	
	Zahl der Pflanzen liert	Mit Sympto- men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Erkrankt
27 <i>Lycopersicon exculentum</i> var. <i>Tiniens</i>	5	0	3	0
28 " " var. <i>Mauthners delicatessa</i>	5	0	5	0
29 " " var. <i>Blondköpfchen</i>	5	0	5	0
30 " " var. <i>Ponderosa purpurviolette</i>	5	0	5	0
31 " " var. <i>Olive</i>	5	0	5	0
32 " " var. <i>Weißbehaart</i>	5	0	5	0
33 " " var. <i>Birnenförmige Gelbe</i>	5	0	3	0
34 " " var. <i>Zuckertomate</i>	5	0	5	0
35 " " var. <i>Pflaumenförmige Rote</i>	5	0	5	0
36 <i>Nicandra physaloides</i>	5	0	5	0
37 <i>Nicotiana silvestris</i>	5	0	5	0
38 " " <i>tabacum</i> var. <i>Sansum</i>	5	0	5	0
39 " " " var. <i>Xantii</i>	5	0	5	0
40 " " "	5	0	5	0
41 <i>Hyoscyamus aureus</i>	5	0	5	0
42 " " <i>niger</i> var. <i>pallidus</i>	5	0	3	3
43 " " <i>muticus</i>	5	0	5	0
44 " " <i>turcomanicus</i>	5	0	5	0
45 <i>Scopolia lurida</i>	5	2	5	2
46 " " <i>physaloides</i>	5	0	5	0
47 " " <i>sirensis</i>	5	0	5	0
48 <i>Solanum nigrum</i>	5	0	5	0
49 <i>Physochlaira orientalis</i>	5	0	5	0
50 <i>Physalis peruviana</i>	5	0	3	2
51 " " <i>alkekenyi</i>	5	0	5	0
52 " " <i>floridiana</i>	5	0	5	0
53 " " <i>ixiocarpa</i>	5	0	5	0
II. Familie Compositae				
1 <i>Calendula officinalis</i>	5	0	5	1
2 " " var. <i>Gelbe Riesen</i>	5	5	5	0
3 " " var. <i>Nova</i>	5	5	5	2

Fortsetzung Tab. 8:

	Pflanzenart	Primär-Inokulation		Rücktest auf Gynura	
		Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Mit Sympto- men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Erkrankt
4	Centaurea moshata var. suaveolus	5	0	5	0
5	Chrysanthemum carinatum var. Kokarde	5	0	5	0
6	" " segetum var. John Bright	5	0	5	0
7	" " parthenium var. Goldball	5	0	5	0
8	" " carinatum	5	0	5	0
9	Guizotia abyssinica	5	0	3	1
10	Gynura aurantiaca	5	5	5	5
11	Helianthus annuus var. Giganteus	5	0	5	0
12	" " var. Nanus	5	0	5	0
13	" " var. Dwarf Sungold	5	0	5	0
14	" " debilis var. Stella	5	0	5	0
15	Layia elegans	5	0	5	0
16	Targetes erecta var. Golddollar	5	0	5	0
17	" " patula var. Carmen	5	0	5	0
18	Tithonia speciosa var. Fakel	5	0	5	0
III. Familie Cucurbitaceae					
1	Cucumis melo var. 45SJ	5	0	5	0
2	" " var. Honey Dew	5	0	5	0
3	" " var. Jumbo Hales Best	5	0	5	0
4	" " var. Zuckerkugel	5	0	5	0
5	" sativus var. National Pickling	5	0	5	0
6	Cucurbita pepo var. Small Sugar	5	0	5	0
7	" maxima var. Black Zucchini	5	0	5	0
8	" maxima var. Blue Hubbard	5	0	5	0
9	Citrulus vulgaris var. New Hampshire Midget	5	0	5	0
10	" vulgaris var. Amerikanische Freiland	5	0	5	0
IV. Familie Chenopodiaceae					
1	Chenopodium hybridum	5	0	5	0
2	" " murale	5	0	5	0
3	" " quinoa	5	0	5	0

Fortsetzung Tab. 8:

Pflanzenart	Primär-Inokulation		Rücktest auf Gynura	
	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Mit Sympto- men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Erkrankt
V. Familie Linaceae				
1 Linum grandiflorum var. rubrum	5	0	5	0
VI. Familie Leguminosae				
1 Phaseolus aureus	5	0	5	0
2 " mungo	5	0	5	0
3 " calcaratus	5	0	5	0
4 Vigna sinensis var. sesquipedalis 'Bursa Bursati'	5	0	5	0
5 " " var. cylindrica	5	0	5	0
6 " " var. sesquipedalis	5	0	5	0
7 " " var. sinensis	5	0	5	0
VII. Familie Acanthaceae				
1 Thunbergia alata var. Schwarzauge	5	0	5	0
VIII. Familie Labiatae				
1 Monarda didyma var. Spielarten	5	0	5	0
2 Lamium amplexicaulis	5	0	5	0

Damit sind die mit diesen Versuchen verbundenen Erwartungen leider nicht ganz erfüllt worden. Es muß weiteren systematischen Untersuchungen und dabei wohl leider auch dem glücklichen Zufall überlassen bleiben, doch noch ein geeigneteres Testsystem aufzufinden.

4.2.2 Der Wirtspflanzenkreis des PSTV

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Ermittlung des Wirtspflanzenkreises des PSTV sind in Tabelle Nr. 9 zusammengefaßt. Daraus ergibt sich, daß 23 der insgesamt 26 untersuchten Tomatensorten vom PSTV infiziert werden können. Alle diese anfälligen Sorten reagierten mit den typischen Symptomen der Triebstauchung und Epinastie und zeigten im Rücktest auf der Tomatensorte "Rutgers" starke Infektiosität. Die drei einzigen als nicht anfällig ermittelten Sorten stammen interessanterweise von ein und demselben Züchter (Hoffmann) ab und es ist daher denkbar, daß sie einen genetisch determinierten Resistenzfaktor tragen, der die Viroid-Infektion verhindert. Es erscheint daher angebracht, diesem Phänomen weiter nachzugehen, da es sich nicht nur für die züchterische Praxis lohnen würde, sondern mit einem solchen System ließe sich unter Umständen auch das Problem der Virus-Resistenz bei Pflanzen gezielt biochemisch angehen. Von den übrigen Solanaceen konnten lediglich noch Scopolia lurida, Solanum nigrum, Physochlaina orientalis und drei Physalis-Arten (P. peruviana, P. floridana und P. ixiocarpa) als sichere Wirtspflanzen des PSTV ermittelt werden. Alle anderen getesteten Pflanzen d. h. rund 70 Arten aus 6 Familien erwiesen sich als nicht anfällig.

Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Gegensatz zu den Resultaten von SEMANCIK und WEATHERS (150) und SEMANCIK et al. (194), die während der Durchführung der

vorliegenden Arbeit publiziert wurden. Diesen Autoren ist es unter kalifornischen Bedingungen gelungen, im heterologen Infektionsversuch mit ExCV-Inokulum bei Tomaten PSTV-ähnliche Symptome hervorzurufen und bei Kartoffeln die Symptome der Spindelknollensucht zu erhalten. Weiterhin berichten sie über die geglückte Übertragung des PSTV auf Gynura, Petunie und Etrog Citron (*Citrus medica* L.), wo es typische Symptome der Exocortis-Krankheit hervorrufen soll.

Mit dem Beginn der eigenen Untersuchungen wurden gerade diese heterologen Infektiositäts-Tests immer wieder durchgeführt. Trotz unzähliger Wiederholungen unter den verschiedensten Bedingungen konnte kein einziger Fall einer positiven heterologen Infektion beobachtet werden. Versuche mit dem gleichen Ziel liefen übrigens bereits vor Beginn dieser Arbeit über 3 Jahre lang in der Arbeitsgruppe Pflanzenvirologie (SÄNGER und RAMM, unveröffentlicht), ohne daß ein positives Ergebnis erzielt werden konnte.

Es erhebt sich somit die Frage, ob nicht etwa die erheblichen klimatischen Unterschiede zwischen Deutschland und Californien für diese Diskrepanz verantwortlich sein könnten. Hinweise dafür konnten inzwischen aus Versuchen erhalten werden, bei denen sich herausstellte, daß eine spektralphotometrisch feststellbare Viroidverseuchung z. B. in Tomate nur bei Temperaturen über 25°C und bei hohen Lichtintensität (möglichst bei Sonnenschein) erfolgt. Während der kühlen und lichtarmen Jahreszeit ist unter den hiesigen Bedingungen selbst mit Zusatzlicht und höheren Gewächshaus-Heiztemperaturen keine normale Viroidvermehrung möglich (SÄNGER, unveröffentlicht). Eine Aufklärung dieser Zusammenhänge muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Tab. 9: Ergebnis der Inokulation verschiedener krautiger Testpflanzen mit PSTV-haltigem Blatthomogenisat von Tomate. Der Infektionserfolg wurde beurteilt nach den auftretenden Primär- bzw. Sekundär-Symptomen und für den Fall symptomloser Infektionen nach dem Ergebnis des Rücktestes auf Tomate.

Pflanzenart	Primär-Inokulation		Rücktest auf Tomate "Rutgers"	
	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Mit Sympto- men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Erkrankt
I. Familie Solanaceae				
1 <i>Datura stramonium</i>	5	0	5	0
2 " var. <i>godronii</i>	3	0	4	0
3 " var. <i>inermis</i>	3	0	4	0
4 " var. <i>tatula</i>	5	0	5	0
5 " var. <i>stramonium</i>	3	0	4	0
6 " <i>meteloides</i>	3	0	4	0
7 " <i>metel</i> var. <i>fastuosa</i>	3	0	4	0
8 " <i>inoxia</i>	3	0	4	0
9 " <i>leichhardtii</i>	3	0	4	0
10 <i>Hyocymus aureus</i>	3	0	4	0
11 " <i>niger</i> var. <i>pallidus</i>	3	0	4	0
12 " <i>muticus</i>	3	0	4	0
13 " <i>turcomanicus</i>	3	0	4	0
14 <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>Homasa Goldkugel</i>	5	0	5	0
15 " var. <i>Hoffmann's Rentita</i>	5	0	5	0
16 " var. <i>Homasa Lizzy</i>	5	0	5	0
17 " var. <i>Hellfrucht-Frühstamm</i>	5	3	5	5
18 " var. <i>mm-Nova F₁ Hybrid</i>	5	4	5	5
19 " <i>Hilda 72</i>	5	3	5	5
20 " var. <i>Haubners Vollendung GS</i>	5	3	5	5
21 " var. <i>Frembgens Rheinlands Ruhm</i>	5	3	5	5
22 " var. <i>Prof. Rudloff</i>	5	4	5	5
23 " var. <i>Drivotomat</i>	5	5	5	5
24 " var. <i>VDB Moneyberg</i>	5	4	5	5
25 " var. <i>Planet</i>	5	2	5	4
26 " var. <i>Rutgers</i>	5	5	5	5

Pflanzenart	Primär-Inokulation		Rücktest auf Tomate "Rutgers"	
	Zahl der Pflanzen Inoku- Mit Sympto- liert men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- Erkrankt liert		
27 <i>Lycopersicum esculentum</i> var. Bonny Best	5	5	5	5
28 " " var. Pomodoro	5	5	5	5
29 " " var. Yellow pear	5	5	5	5
30 " " var. Tiniens	5	5	5	5
31 " " var. Mauthners Delicatesse	5	5	5	4
32 " " var. Blondköpfchen	5	5	5	5
33 " " var. Ponderosa Purpurviolette	5	5	5	5
34 " " var. Olive	5	5	5	5
35 " " var. Weißbehaart	5	5	5	5
36 " " var. VF Tomato Hybrid	5	5	5	5
37 " " var. Birnenförmige Gelbe	5	5	5	5
38 " " var. Zuckertomate	5	5	5	5
39 " " var. Pflaumenförmige Rote	5	5	5	5
40 <i>Nicandra physaloides</i>	5	5	5	0
41 <i>Nicotiana silvestris</i>	5	5	5	0
42 " " tabacum var. Sansum	5	5	5	0
43 " " var. Xanti	5	5	5	0
44 " " "	3	4	4	0
45 <i>Scopolia lurida</i>	3	4	4	4
46 " " physaloides	5	5	5	0
47 " " sinensis	5	5	5	0
48 <i>Solanum nigrum</i>	5	5	5	4
49 <i>Physochlaina orientalis</i>	5	5	5	4
50 <i>Physalis peruviana</i>	3	4	4	4
51 " alkekenyi	3	4	4	4
52 " floridiana	3	5	5	0
53 " ixiocarpa	3	4	4	4
II. Familie Compositae				
1 <i>Calendula officinalis</i>	5	5	5	0
2 " " var. Gelbe Riesen	5	5	5	0

		Primär-Inokulation		Rücktest auf Tomate "Rutgers"	
Pflanzenart		Zahl der Pflanzen Inoku- Mit Sympto- liert men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- Erkrankt		
3	Calendula officinalis var. Nova	5	2	5	0
4	Centaurea moschata var. Suaveolus	5	0	5	0
5	Chrysanthemum carinatum	5	0	5	0
6	" " var. Kokarde	5	0	5	0
7	" " segetum var. John Bright	5	0	5	0
8	" " parthenium var. Goldball	5	0	5	0
9	Coreopsis grandiflora var. Mayfield-Riesen	5	0	5	0
10	Cosmos bipinnatus	5	2	5	0
11	Guizotia abyssinica	5	0	5	0
12	Gynura aurantiaca	5	0	5	0
13	Helianthus annuus var. Giganteus	5	0	5	0
14	" " var. Nanus	5	0	5	0
15	" " var. Dwarf Sungold	5	0	5	0
16	" " debilis var. Stella	5	4	5	0
17	Layia elegans	5	0	5	0
III. Familie Cucurbitaceae					
1	Cucumis melo var. 45-SJ	5	0	5	0
2	" " var. Honey Dew	5	0	5	0
3	" " var. Jumbo Hales Best	5	0	5	0
4	" " var. Zuckerkugel	5	0	5	0
5	" sativus var. National Pickling	5	0	5	0
6	Cucurbita pepo var. Small Sugar	5	0	5	0
7	" maxima var. Black Zucchini	5	1	5	0
8	" " var. Blue Hubbard	5	1	5	0
9	" " var. Pink Banana G	5	0	5	0
10	Citrulus vulgaris var. New Hampshire Midget	5	0	5	0
11	" " var. Amerikanische Freiland	5	0	5	0

		Primär-Inokulation		Rücktest auf Tomate "Rutgers"	
Pflanzenart		Zahl der Pflanzen Inoku- Mit Sympto- liert men erkrankt	Zahl der Pflanzen Inoku- liert	Erkrankt	
IV. Familie Chenopodiaceae					
1	Chenopodium hybridum	5	0	5	0
2	" murale	5	0	5	0
3	" quinosa	5	0	5	0
V. Familie Linaceae					
1	Linum grandiflorum var. rubrum	5	0	5	0
VI. Familie Leguminosae					
1	Phaseolus aureus	5	0	5	0
2	" mungo	5	0	5	0
3	" clacaratius	5	0	5	0
4	Vigna sinensis var. cylindricus	5	0	5	0
5	" var. sesquipedalis	5	0	5	0
6	" var. sesquipedalis 'Busa Bursati'	5	0	5	0
7	" var. sinensis	5	0	5	0
VII. Familie Acanthaceae					
1	Thunbergia alata var. Schwarzauge	5	0	5	0
VIII. Familie Labiatae					
1	Monarda didyma var. "Spielarten"	5	0	5	0
2	Lamium amplexicaulis	5	0	5	0

Zusammenfassend kann man also feststellen, daß der Wirtspflanzenkreis beider Krankheitserreger relativ eng und spezifisch ist und daß im Hinblick auf die induzierten Symptome eine gewisse Ähnlichkeit zwischen beiden Pathogenen besteht. Allerdings muß betont werden, daß diese Symptom-Ähnlichkeit eher eine Folge des vergleichbaren Pathogenitätsmechanismus als der wirklichen molekularen Identität sein kann.

4.3. Die Ermittlung der Samenübertragbarkeit des ExCV

Nach den Untersuchungen von Singh (159) und Hunter et al. (79) kann das PSTV bei Kartoffeln und Tomaten durch den Samen übertragen werden. Dieser Befund stammt aus einer Zeit als man das PSTV noch für ein Virus hielt und keine Vorstellung über die wirkliche Natur des Agens hatte. Nachdem sich jetzt herausgestellt hat, daß das ExCV zur gleichen Erregergruppe gehört, erschien es angebracht auch die Samenübertragbarkeit des EsCV zu testen. Dies wurde experimentell vor allem deshalb möglich, weil ein für diesen Zweck geeignetes Testpflanzensystem zur Verfügung stand. Und zwar handelt es sich dabei um die Solanaceen Physalis peruviana und Physalis floridana, die zu den wenigen ExCV-anfälligen Pflanzen zählen, die gleichzeitig einen relativ reichen Ertrag keimfähiger Samen bringen. Die Standard-Testpflanze Gynura aurantiaca hingegen entwickelte unter unseren Bedingungen ausschließlich sterile Samen. Saatgut von EsCV-infizierten Citrus war nicht zu beschaffen und von infizierten Potunia hybrida konnten leider keine brauchbaren Samenproben gewonnen werden.

Für den Samenübertragbarkeits-Test werden ExCV-infizierte Einzelpflanzen von Physalis floridana und Physalis peruviana ausgewählt. Da diese Arten unter den bei uns herrschenden Wachstumsbedingungen symptom-

los auf die Infektion mit dem ExCV reagieren, mußte vorher die systemische Anwesenheit des Viroids durch den Rücktest auf Gynura nachgewiesen werden. Von beiden *Physalis*-Arten wurden so je 10 ExCV-infizierte Samenträger aufgestellt, von denen Saatgut abgenommen und entsprechend für den Versuch vorbereitet wurde. Tabelle 10 zeigt das Ergebnis des Infektionstests einer Mischprobe von jeweils 25 Sämlingen dieser kranken Pflanzen. Man kann daraus ersehen, daß mit diesen Testverfahren die Samenübertragbarkeit des ExCV bei *Physalis* eindeutig nachzuweisen ist. Das im Bezug auf die einzelnen Samenpflanzen sehr unterschiedliche Ergebnis könnte einerseits mit der Variabilität des biologischen Tests zusammenhängen, aber es kann andererseits auch die bei der Samenübertragung von Viren zu beobachtenden natürlichen Schwankungen im Prozentsatz kranker Nachkommen widerspiegeln.

Zur Aufklärung dieser Frage wurde daher eine größere Anzahl von Einzelpflanzen aus der Nachkommenschaft kranker Samen getestet. Tabelle Nr. 11 zeigt das Ergebnis einer solchen Einzeltest-Versuchsserie. Auch mit diesem Testverfahren findet man zwischen den einzelnen Nachkommenschaften relativ große Schwankungen. Der Prozentsatz an Pflanzen, die durch Samenübertragungen erkrankten, beträgt im Durchschnitt etwa 56,0 % bei *Physalis floridana* und 46,0 % bei *Physalis peruviana*.

Dieses Ergebnis zeigt die potentielle Samenübertragbarkeit des ExCV bei zwei krautigen Testpflanzen und man kann daher annehmen, daß es auch noch bei einigen anderen Arten Samen-übertragbar ist. Diese Eigenschaft hat allerdings bei der Ausbreitung des Viroids in Citrus relativ geringe Bedeutung, da hier die vegetative Vermehrung der Wirtspflanze im Vordergrund steht. In diesem Zusammenhang ist allerdings noch die Frage ungeklärt, ob das ExCV auch pollenübertragbar ist und auch auf diese Weise von kranken auf gesunde Pflanzen übertragen werden kann. Vorläufige

Tabelle 10: Die Samenübertragbarkeit des ExCV bei *Physalis*
gemessen am Infektionserfolg eines Gewebehomogenisats
von jeweils 25 *Physalis*-Sämlingen bei *Gynura*

ExCV-infizierte Samenträger-Pflanze Nr.	Infektionserfolg bei <i>Gynura</i> Sämlingsprobe von	
	<i>Physalis</i> <i>floridana</i>	<i>Physalis</i> <i>peruviana</i>
1	1/5	3/5
2	3/5	3/5
3	0/5	5/5
4	5/5	0/5
5	3/5	0/5
6	4/5	4/5
7	4/5	3/5
8	0/5	5/5
9	5/5	0/5
10	3/5	0/5
Durchschnittswert	28/5 = 56,0 %	23/5 = 46,0 %

a) Der Zähler gibt die Zahl der erkrankten, der Nenner die Zahl der insgesamt inokulierten *Gynura*-Pflanzen an.

Tabelle 11: Die Samenübertragbarkeit des ExCV bei *Physalis*, ermittelt im Einzeltest der Nachkommenschaft auf Gynura

	<i>Physalis floridana</i>				<i>Physalis peruviana</i>			
	Getestete SÄmlinge		ExCV-krankte SÄmlinge		Getestete SÄmlinge		ExCV-krankte SÄmlinge	
		%	Satz SÄmlinge	% ExCV-kranker SÄmlinge				% ExCV-kranker SÄmlinge
1	18	8	44,4		20	11		55,0
2	57	7	12,3		20	8		40,0
3	49	1	2,0		25	13		52,0
4	19	13	68,4		25	2		8,0
5	25	11	44,0		25	4		16,0
6	15	9	60,0		25	15		60,0
7	46	28	60,8		25	19		76,0
8	30	4	13,3		25	12		48,0
9	43	18	41,8		25	6		24,0
10	20	6	30,0		25	2		8,0
Durchschnittswerte	322	105	32,6		240	92		38,3

Tests zum Nachweis des ExCV in Pollen von Physalis und Petunia verliefen zwar negativ, aber angesichts der beim ExCV üblichen Übertragungsschwierigkeiten kann ein endgültiges Urteil erst nach einer entsprechend großen Testserie gefällt werden.

Da die Samenübertragbarkeit des PSTV mehrfach gesichert ist, bestand keine Notwendigkeit, diese noch einmal zu prüfen. Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Viroide grundsätzlich samenübertragbar sind, was ihre Gefährlichkeit besonders unterstreicht.

4.4 Bestimmung der Latenzzeit für das ExCV und das PSTV

Die Bestimmung der Latenzzeit für die beiden hier behandelten Krankheitserreger ist deshalb besonders wichtig, weil ihre Symptome relativ spät ausgeprägt werden und weil man annehmen kann, daß diese keinen Maßstab für die Viroid-Vermehrung darstellen. Es zeigte sich nämlich, daß das Pflanzengewebe schon zu einem Zeitpunkt hochinfektiös ist, wo noch keinerlei äußeren Symptome sichtbar sind.

4.4.1 Die Latenzzeit des ExCV in Gynura aurantiaca

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Latenzzeit für das ExCV in Gynura aurantiaca sind in Abb. 9 graphisch dargestellt. Zu dieser Darstellungsweise ist zu bemerken, daß die Ergebnisse aus Gründen der Übersichtlichkeit für Intervalle von 4 Tagen dargestellt sind, zumal sich zeigte, daß die ermittelten Zwischenwerte ohnehin den gleichen Trend wie die dargestellten Werte hatten.

Man kann aus Abb. 9 erkennen, daß mit der Standard-Methode des Nachweises das ExCV erst 32 Tage nach der Inokulation

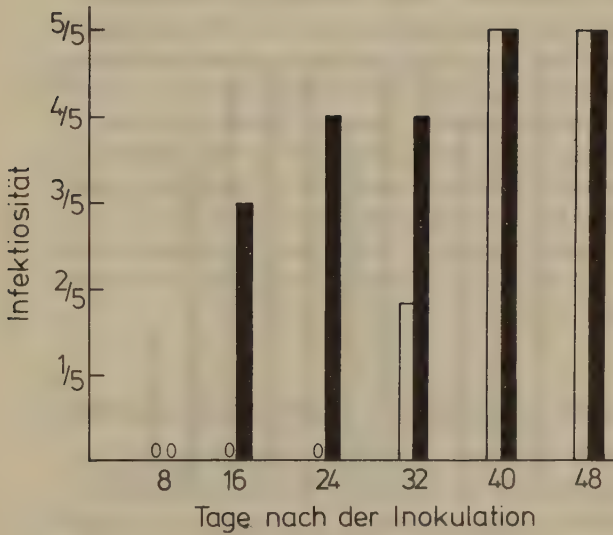


Abb. 9: Versuch zur Feststellung der Latenzzeit bei ExCV-Infektion von Gynura aurantiaca, durch Infektiositätstests mit Blatthomogenisaten von primärinfizierten Gynura-Stecklinge.

- = Primärsymptome der Testpflanzen 40 Tage nach der Inokulation
- = Folgesymptome der Testpflanzen 80 Tage nach der Inokulation im Neuaustrieb nach Dekapitation

in Gynura festgestellt werden kann. Mit dem empfindlichen Test über die Bonitur des Neu-Austriebs nach der Dekapitation ist das ExCV bereits 16 Tage nach der Inokulation nachweisbar. Damit beträgt die Latenzzeit des ExCV bei Gynura aurantiaca unter den Voraussetzungen des Tests und der örtlichen Klimabedingungen 16 Tage. Dieser noch immer relativ lange Zeitraum dürfte in erster Linie damit zusammenhängen, daß die Inokulation des ExCV in den Stengel erfolgen muß und daß der Nachweis in den Blättern naturgemäß erst dann möglich ist, wenn sich das ExCV bis dorthin ausgebreitet hat. Es ist anzunehmen, daß nach einer Blatt-Inokulation des ExCV z. B. bei *Physalis* eine wesentlich kürzere Latenzzeit gefunden wird.

4.4.2 Die Latenzzeit des PSTV in Tomate, Sorte Rutgers

Die Latenzzeit des PSTV in Tomate beträgt nach Abb. 10 4 Tage, wenn man sie im einfachen Testverfahren nach dem Erscheinen primärer Symptome im Haupttrieb ermittelt. Durch die Dekapitation der Testpflanze erhält man in einem wesentlich empfindlicheren Testsystem, so daß dann das PSTV bereits zwei Tage nach der Inokulation im Blattgewebe nachgewiesen werden kann. Dies bedeutet, daß in der kurzen Zeit eine biologisch meßbare Konzentration von PSTV-RNS neu synthetisiert worden sein muß. Es kann sich dabei nicht um residuales Inokulum handeln, welches z.B. bei konventionellen Viren das Ergebnis verfälschen kann, weil sich im Inokulum nur freie, ungeschützte Viroid-RNS befindet. Alle freie RNS aber, die nicht mit der Inokulation in die Zelle gelangen konnte, wird sofort durch RNasen inaktiviert und ist damit nicht mehr im biologischen Test nachweisbar.

Die kurze Latenzzeit von nur 2 Tagen ist angesichts der sehr effektiven Blatt-Inokulation mit Hilfe von Karborund

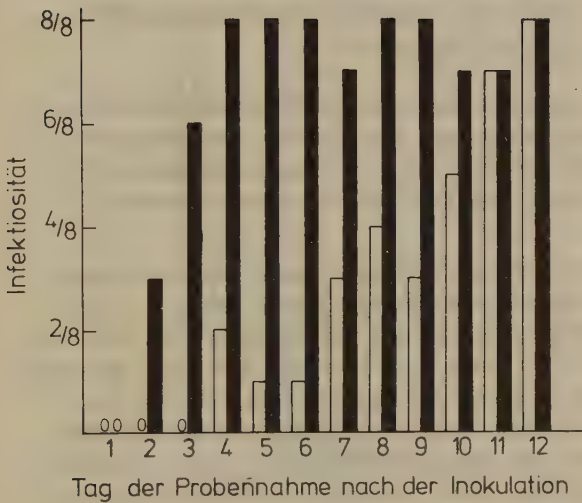


Abb. 10: Versuch zur Feststellung der Latenzzeit bei PSTV-Infektion von Tomate, Sorte 'Rutgers' durch Infektiositätstests mit Blatthomogenisaten von primärinfizierten Tomaten-Sämlingen

- = Primärsymptome der Testpflanzen 30 Tage nach der Inokulation
- = Folgesymptome der Testpflanzen 45 Tage nach der Inokulation im Neuaustrieb nach Dekapitation

nicht sonderlich überraschend und liegt im Bereich der Latenzzeiten konventioneller Pflanzenviren wie z. B. der des Tabakmosaikvirus.

4.5 Die Bestimmung der relativen Infektiosität des ExCV in *Gynura aurantiaca*

Für die Gewinnung von möglichst infektiösem Blattmaterial für die Viroid-Vermehrung, -Inokulation und -Reinigung war es wichtig herauszufinden, welche Teile der ExCV-Testpflanze *Gynura* die höchsten Infektiositätswerte besitzen.

Zur Durchführung dieses Versuches wurden *Gynura*-pflanzen ausgewählt, die eine Durchschnittsgröße von 20 cm hatten. Diese Pflanzen wurden mit dem Fakirbett in der mittleren Region, d. h. etwa 5 cm oberhalb des Wurzelansatzes und 5 cm etwa unterhalb der Spitze in üblicher Weise inokuliert. Die Ausprägung deutlicher Symptome dauerte in Abhängigkeit von den Klimabedingungen etwa 3-5 Wochen. Nach dem Auftreten klarer Symptome wurden kräftige gut entwickelte Krankpflanzen ausgewählt. Dann wurde jedes einzelne Blatt dieser Pflanzen von der Spitze ausgehend nummeriert und mit einem Korkbohrer wurden anschließend von diesen einzelnen Blättern Scheiben für den Infektiositätstest entnommen.

Das Ergebnis der Bestimmung der relativen Infektiosität ist in Abb. 11 dargestellt. Als erstes kann man erkennen, daß die Testpflanze während des Versuchs ihre Länge etwa verdoppelt hat, was bedeutet, daß sich auch die Zahl der Blätter etwa verdoppelte.

Der Infektiositätstest zeigt, daß nur in diesem Neuzuwachs von Blättern - die allerdings zur Zeit der Inokulation bereits als Primordien vorhanden waren - das Viroid nachzuweisen ist. Die ältesten Blätter dieses Neuzuwachses

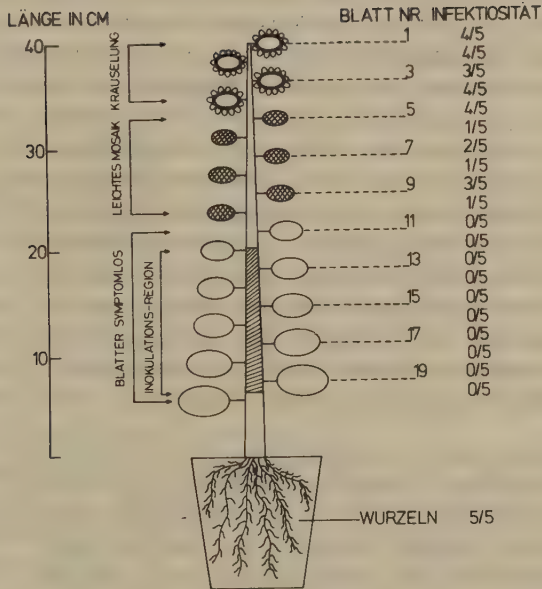


Abb. 11: Schematische Darstellung der relativen Infektiosität des ExCV in den Blättern einer Gynura-Pflanze vier Wochen nach der Inokulation.

Die Infektiosität ist angegeben als Quotient, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten Pflanzen und der Nenner die Zahl der inokulierten Pflanzen angibt.

zeigen Mosaiksymptome, während die jungen noch nicht vollentwickelten spitzen Blätter die stärkste Symptomausprägung mit Kräuselung und Epinastie aufweisen. Alle diese symptomtragenden Blätter ergeben im Rücktest auf Gynurapflanzen den größten Infektionserfolg. Das bedeutet, daß man nur solche Blätter für die Weitervermehrung, Isolation und Reinigung des Viroids verwenden sollte. Alle Blätter, die im Bereich der Inokulationsregion liegen, sind ohne Symptome und in ihnen läßt sich kein Viroid nachweisen. Da der Stengel der Gynura sehr fest ist und in seinem unteren Teil schnell verholzt, wurde der Stengel nicht gesondert getestet. Die Wurzel hingegen, die als Infektiositäts-Reservoir für die mögliche Übertragung des ExCV durch Nematoden oder Pilze in Frage kommen, wurden auf ihre Infektiosität getestet. Dabei zeigte sich, daß die Wurzeln kranker Gynurapflanzen eine sehr hohe Viroid-Konzentration besitzen.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß sich das ExCV im wesentlichen nur in denjenigen Teilen der Pflanzen vermehrt und ausbreitet, die etwa zur Zeit der Inokulation als Blattprimordien vorhanden sind und die dann nach etwa 3-5 Wochen nach der Inokulation als neu zuwachsende Blätter mit Symptomen in Erscheinung treten. Es sind nur diese Blätter, die sich als Ausgangsmaterial für die Viroidvermehrung eignen.

4.6 Versuche zur Erhöhung des Infektionserfolges durch Zusatz von Dimethylsulfoxyd (DMSO) und DEAE-Dextran zum Inokulum

Da beide Viroide im Vergleich zu konventionellen Viren relativ schwer mechanisch übertragbar sind, sollte versucht werden, durch chemische Zusätze den Infektionserfolg zu erhöhen. Zu diesem Zweck boten sich Dimethylsulfoxyd (DMSO) und DEAE-Dextran als Additive an, weil

sie bereits bei verschiedenen Virussystemen den Infektionserfolg wesentlich verbesserten.

So zeigte sich, daß DMSO als Zusatz zu Tabakmosaikvirus-Inokulum bei der Übertragung auf Bohnenblätter im Vergleich zur Puffer-Kontrolle etwa die doppelte Anzahl von Lokalläsionen hervorruft (42). Weiterhin ist bekannt, daß DMSO im Polyomavirus-System die Virusvermehrung deutlich steigert (94). DEAE-Dextran hingegen erwies sich als infektionsfördernd bei der Infektion von Zellkulturen mit Poliovirus (100, 129), Maul- und Klauenseuche-Virus (6), Mengovirus (66) und Rhinovirus (43).

Das DMSO ist eine basische Flüssigkeit mit außerordentlichen Solubilisations- und Penetrations-Eigenschaften (104) und mit relativ geringer Phytotoxizität (130). Es war daher anzunehmen, daß vor allem über den Penetrations-Effekt des DMSO die Einschleusung der Viroide während der Inokulation gefördert würde, was zu einer Erhöhung des Infektionserfolges führen sollte.

Beim DEAE-Dextran handelt es sich um ein polykationisches Derivat des Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 500 000 Dalton, bei dem die Diäthylamino-äthyl-Gruppen über Ätherbrücken mit Glukoseresten verbunden sind. Damit ist DEAE-Dextran ein Polyelektrolyt, der mit negativ geladenen Molekülen und Zellstrukturen in Wechselwirkungen treten kann. Man nimmt daher auch an, daß DEAE-Dextran mit den viralen Nukleinsäuren einen Komplex bildet, der diese vor der Inaktivierung durch Nukleasen schützt. Als Ergebnis dieses Effekts kann es zu einer Erhöhung des Infektionserfolges im Vergleich zu der DEAE-Dextran-freien Kontrolle kommen. Da es sich bei den Viroiden um "nackte" Ribonukleinsäure handelt, ist theoretisch auch hier eine Infektionsförderung zu erwarten.

4.6.1 Der Einfluß von DMSO und DEAE-Dextran auf den Infektionserfolg des ExCV

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in zwei Abbildungen zusammengefaßt, wobei in Abb. 12 die Resultate für eine Verdünnung des Inokulums von 1:10 und in Abb. 13 von derjenigen für die Verdünnung 1:100 dargestellt sind. Der Infektionserfolg wurde dabei an vier Terminen (35, 45, 60 und 80 Tage nach der Inokulation) bestimmt, weil sich herausgestellt hatte, daß unter unseren Bedingungen bei der Infektion mit niedrigen Viroid-Konzentrationen ein negatives Ergebnis nach 35 Tagen durchaus noch zu einem positiven Resultat werden kann, wenn man insgesamt zwei Monate bis zur abschließenden Bonitur wartet. Andererseits ist es mit dieser Art der Bonitur sehr viel einfacher, auch eine mögliche Symptomverfrühung durch die Additive festzustellen.

In beiden Abbildungen kann man auf den ersten Blick erkennen, daß DEAE-Dextran in allen angewendeten Konzentrationen deutlich schlechter ist als die Kontrolle und als der DMSO-Zusatz.

Beim DMSO hingegen zeigt sich, daß bei einer Konzentration von 0,1 % und einer Inokulumverdünnung von 1:10 die Symptome der ExCV-Erkrankung bei Gynura deutlich früher und vor allem gleichmäßiger auftreten. Im Vergleich zur Kontrolle erscheint der Infektionserfolg nach 35 und 45 Tagen im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt. Allerdings bestehen nach 60 und 80 Tagen keine Unterschiede mehr zur Puffer-Kontrolle ohne Zusätze (Abb. 12).

Bei höheren DMSO-Konzentrationen und auch bei höheren Inokulumverdünnungen ist auch dieser Symptom-Verfrühungs-Effekt nicht mehr so deutlich sichtbar. Es zeigt sich hier vielmehr bei fast allen Kombinationen, daß spätestens 60 Tage nach der Inokulation die Puffer-Kontrolle und das DMSO-haltige Inokulum den gleichen Infektionserfolg auf-

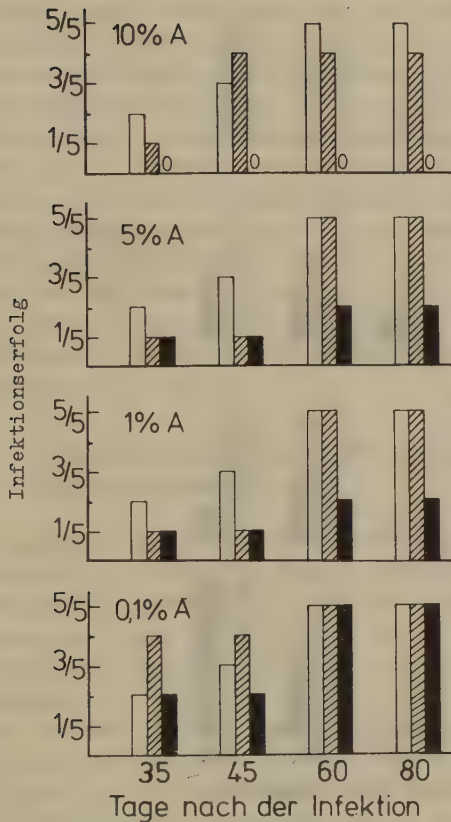


Abb. 12: Einfluß von Dimethylsulfoxyd (DMSO) und DEAE-Dextran als Additive in vier verschiedenen Konzentrationen auf den Infektionserfolg bei ExCV auf Gynura (Inokulum-Verdünnung 1:10). Der Infektionserfolg wird als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten und der Nenner die Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen angibt.

- A = Additive
 □ = Kontrolle
 ▨ = DMSO
 ■ = DEAE-Dextran

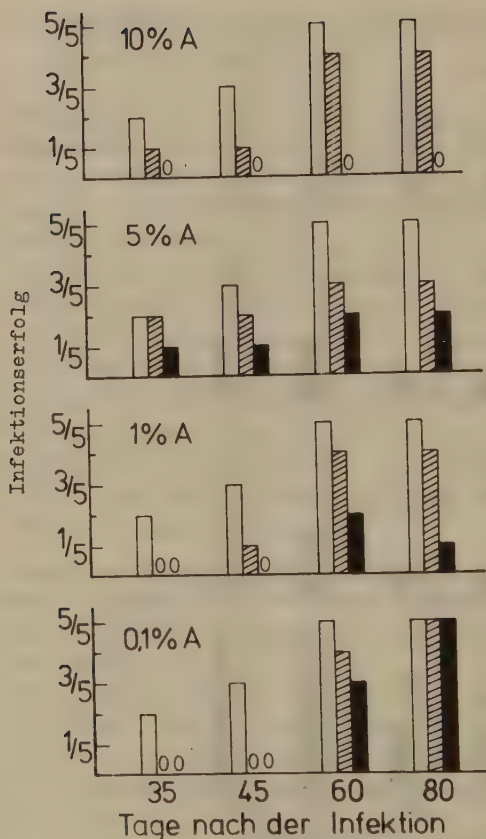


Abb. 13: Einfluß von Dimethylsulfoxid (DMSO) und DEAE-Dextran als Additiv in vier verschiedenen Konzentrationen auf den Infektionserfolg bei ExCV auf Gynura. Verdünnung des Inokulums 1:100. Der Infektionserfolg wird als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten und der Nenner die Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen angibt.

- A = Additive
 □ = Kontrolle
 ▨ = DMSO
 ■ = DEAE-Dextran

weisen. Diese Ergebnisse gelten auch für die (nicht abgebildete) höchste der getesteten Inokulum-Verdünnungen von 1:1000, so daß man annehmen kann, daß dies bei weniger infektiösen Proben ähnlich sein dürfte. Gerade dieses Resultat zeigt aber, daß der DMSO-Zusatz keinen besonderen Vorteil bei kritischen Proben mit sich bringt, bei denen optimale Infektionserfolge besonders wichtig wären. Dies bedeutet, daß für die praktischen Zwecke des biologischen Screening-Tests, wie z. B. zum Nachweis des ExCV bei Citrus-Mutterbäumen auf den Zusatz von DMSO ohne Nachteile verzichtet werden kann. Hier sind es vor allem geeignete Pufferlösungen und die Homogenisation des Blattgewebes bei 4°C, die einen entscheidenden Einfluß auf den Infektionserfolg haben.

4.6.2 Der Einfluß der Additive auf die Infektion von Tomate mit dem PSTV

Im Vergleich zu den Versuchen mit dem ExCV auf Gynura wurde auch der Einfluß der Additive auf die Infektion von Tomate mit dem PSTV getestet. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in den Abb. 14 und 15 dargestellt. Es zeigt sich, daß hier die Resultate fast umgekehrt im Vergleich zu denen sind, die bei dem ExCV erhalten wurden. Während dort das DMSO unter bestimmten Bedingungen den Infektionserfolg erhöhen kann, ist bei dem PSTV mit Tomate das DMSO stets schlechter als die Kontrollinokulation mit Puffer ohne Zusatz und es ist außerdem schlechter als der DEAE-Dextran-Zusatz. Von beiden Zusätzen ist in keiner der getesteten Kombinationen von Inokulumverdünnung und Additiv-Konzentration eine Erhöhung des Infektionserfolges zu beobachten, in allen Fällen ist vielmehr die Pufferkontrolle deutlich überlegen. Um auch hier - ähnlich wie bei dem Exocortis-Gynura-System - festzustellen, ob unter Umständen die Primärsymptome bei Anwendung der Additive früher erscheinen, wurden Boni-

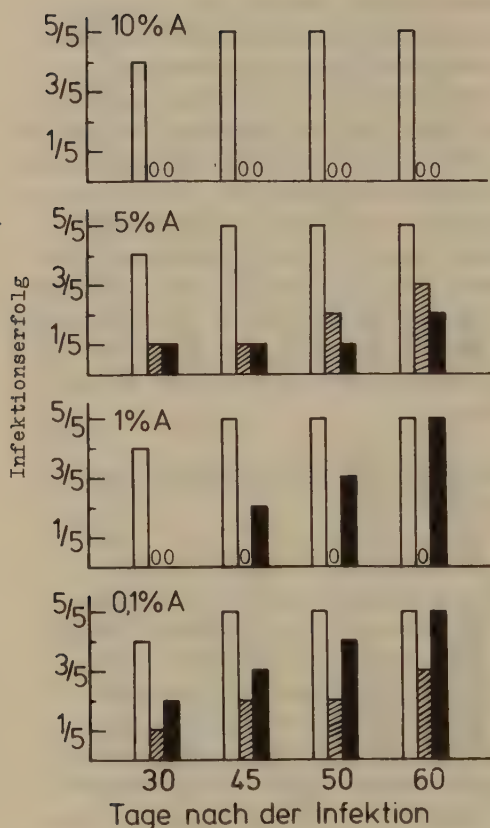


Abb. 14: Einfluß von Dimethylsulfoxid (DMSO) und DEAE-Dextran als Additiv in vier verschiedenen Konzentrationen auf den Infektionserfolg bei PSTV auf Tomate (Verdünnung 1:10). Der Infektionserfolg wird als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten und der Nenner die Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen angibt.

A = Additive
 □ = Kontrolle
 ▨ = DMSO
 ■ = DEAE-Dextran

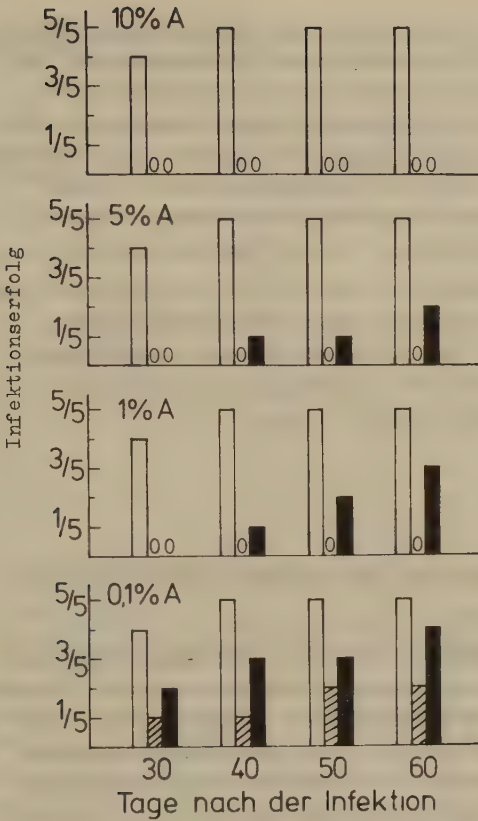


Abb. 15: Einfluß von Dimethylsulfoxid (DMSO) und DEAE-Dextran als Additiv in vier verschiedenen Konzentrationen auf den Infektionserfolg bei PSTV auf Tomate (Verdünnung 1:100). Der Infektionserfolg wird als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten und der Nenner die Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen angibt.

- A = Additive
 □ = Kontrolle
 ▨ = DMSO
 ■ = DEAE-Dextran

turen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion durchgeführt. Aus den Abbildungen kann man ersehen, daß die beiden Zusätze den Infektionserfolg bei Tomate immer drastisch negativ beeinflussen. Dieser negative Einfluß ist am deutlichsten bei einer Konzentration der Additive von 10 % und es zeigt sich weiterhin, daß bei hohen Inokulumverdünnungen praktisch keine einzige Pflanze mehr nach der Inokulation mit den Zusätzen erkrankte.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die beiden DMSO und DEAE-Sephadex keinen infektionsfördernden Effekt bei beiden Viroid-Test-Systemen besitzen. Damit haben sich die Erwartungen nicht erfüllt, die ursprünglich in diese Substanzen gesetzt wurden.

4.7 Die Bestimmung der Verdünnungs-Endpunkte für ExCV und PSTV

Der Verdünnungs-Endpunkt ist eine derjenigen Eigenschaften, die auf einfache Weise im biologischen Test zu ermitteln sind. Er gibt Hinweise auf die Konzentration der Viroide im Gewebe und er erlaubt es die Möglichkeiten abzuschätzen, inwieweit ein Inokulum unter praktischen Bedingungen zur Übertragung der Viroide z. B. für Vermehrungszwecke verdünnt werden kann.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zur Vermittlung des Verdünnungs-Endpunktes sind in Tab. 12 für das ExCV und PSTV zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß der Verdünnungs-Endpunkt ExCV bei 10^{-5} liegt, während man PSTV-Inokula bis zu 10^{-7} verdünnen kann. Man kann aus diesen Resultaten weiterhin entnehmen, daß unter den Versuchsbedingungen die Viroid-Konzentration des ExCV in Gynura, gemessen an diesem biologischen Test, um zwei Zehner-Potenzen niedriger ist als die Konzentration

Tabelle 12: Bestimmung der Verdünnungs-Endpunkte für ExCV und PSTV

Inokulum- Verdünnung	Infektionserfolg ¹⁾	
	ExCV	PSTV
10 ⁻¹	5/5	10/10
10 ⁻²	5/5	10/10
10 ⁻³	4/5	6/10
10 ⁻⁴	3/10	8/20
10 ⁻⁵	1/20	5/20
10 ⁻⁶	0/30	5/30
10 ⁻⁷	0/30	1/30

- 1) Der Infektionserfolg ist als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten und der Nenner die Zahl der insgesamt inokulierten Pflanzen angibt.

des PSTV inTomate. Beim Vergleich dieser Ergebnisse muß man sich allerdings stets vor Augen halten, daß der Infektionserfolg in beiden Testpflanzen-Systemen allein durch die unterschiedliche Inokulationsmethode nicht direkt vergleichbar ist. Man kann sich vorstellen, daß der Infektionserfolg bei der Blattabreibung mit Kaborund im Falle des PSTV auf Tomate größere Infektionschancen hat als die "Fakirbett"-Inokulation des ExCV auf Gynura. Schließlich ist noch zu bemerken, daß die "Alles-oder-Nichts"-Reaktion beider Infektiositäts-Tests eine sehr viel ungenauere Analyse erlaubt, als dies bei einem konventionellen Lokalläsionen-System der Fall ist.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß beide Viroide Verdünnungs-Endpunkte besitzen, wie sie für konventionelle

Viren bekannt und üblich sind. Ein direkter und mehr quantitativer Vergleich wird erst dann möglich sein, wenn man eine gemeinsame Testpflanze für beide Viroide findet, die mit eindeutigen Symptomen reagiert oder wenn man schließlich einen gemeinsamen Lokalläsionen-Wirt für beide Viroide findet.

4.8 Ermittlung der Beständigkeit in vitro

Die Untersuchungen zur Beständigkeit in vitro dienten in erster Linie dazu, nachzuprüfen, inwieweit die Infektiosität der Viroide während der Inokulation erhalten bleibt oder inaktiviert wird. Sowohl für den biologischen Test als auch für die Viroid-Vermehrung zum Zwecke der Gewinnung von größeren Mengen hochinfektiösen Blattmaterials ist es unvermeidlich, daß Blatthomogenisate über kürzere oder längere Zeiten stehen bleiben, weil sich der Inokulationsvorgang vor allem bei dem ExCV über einen längeren Zeitraum erstreckt. Da unter praktischen Bedingungen das Inokulum ein rohes Blatthomogenisat ist, welches im Mörser unter Puffer-Zusatz hergestellt und bei $+4^{\circ}\text{C}$ in einem Eisbad aufbewahrt wird, wurde der Beständigkeitsversuch unter diesen praxisnahen Bedingungen durchgeführt.

Zur klareren Darstellung des möglichen Infektiositäts-Verlustes während der Aufbewahrungszeit wurden jeweils drei Verdünnungen (1:100, 1:500, 1:1000) hergestellt und inokuliert. Das Ergebnis einer solchen Versuchsserie ist in Abb. 16 dargestellt. Man kann daraus entnehmen, daß in einem rohen ungeklärten Blatthomogenisat der Infektiositätsverlust über einen Zeitraum von 3 Stunden unter Berücksichtigung praktischer Gesichtspunkte so unbedeutend ist, daß keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden müssen, solange man von hochinfektiösem Blattmaterial ausgeht. Unter diesen Bedingungen ist es dem-

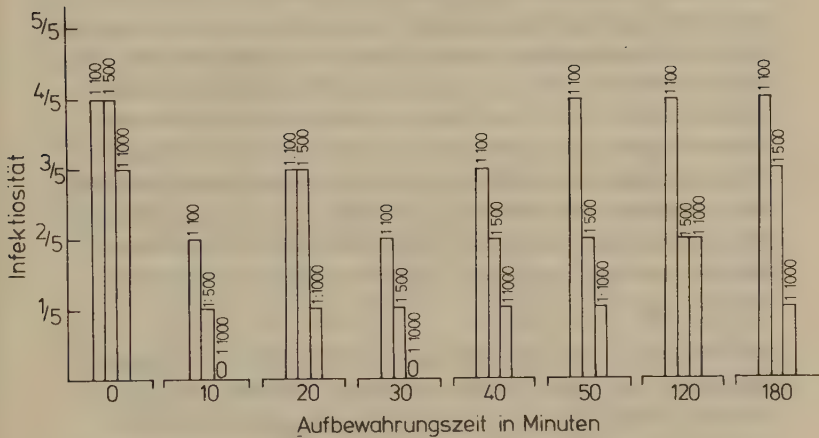


Abb. 16: Die Infektiosität von ExCV-haltigen rohen Blatthomogenisaten in Abhängigkeit von der Aufbewahrungsdauer nach der Homogenisation.¹⁾

Säule 1 = Inokulum-Verdünnung 1: 100

Säule 2 = Inokulum-Verdünnung 1: 500

Säule 3 = Inokulum-Verdünnung 1:1000

1) Homogenisation und Aufbewahrung der Inokula erfolgte im Eisbad bei +4°C.

nach auch nicht unbedingt erforderlich, infektionsfördernde Zusätze wie z. B. das RNase-Absorbierende Bentonit zu verwenden, vorausgesetzt, man hält das Inokulum im Eisbad.

Ergänzend zu diesen Versuchen, bei denen das Inokulum stets aus frischem Blattmaterial hergestellt wird, wurde noch versucht zu prüfen, ob es möglich ist, ExCV-haltiges Blattmaterial eingefroren zu lagern und bei Bedarf aufzutauen, um es dann zur ExCV-Vermehrung zu verwenden. Damit sollte weiterhin festgestellt werden, ob es unter Umständen auch möglich ist, aus tiefgefrorenem Blattmaterial infektiöse Viroid-RNS durch Extraktion der Nukleinsäuren mit Phenol zu gewinnen. Falls dies möglich ist, könnte man einen Materialvorrat für biochemische Zwecke jederzeit in einer Tiefkühltruhe zur Verfügung haben.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. 13 zusammengestellt. Man kann daraus entnehmen, daß das Tiefgefrieren von Blattproben und ihre Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe in tiefgefrorenem Zustand im Prinzip den gleichen Infektionserfolg ergibt, wie die Vergleichsprobe, die homogenisiert und sofort inokuliert wird. Es ist klar, daß bei diesem Verfahren die Homogenisation des Blattmaterials und die Aufbewahrung des Homogenisats während der Inokulation bei $+4^{\circ}\text{C}$ erfolgen muß, um die inaktivierende Wirkung der RNase auf ein Minimum zu reduzieren. Dieses Resultat läßt weiterhin vermuten, daß es möglich sein müßte, Viroid-haltiges Blattmaterial eingefroren zu lagern, um es dann in Gegenwart von Phenol aufzutauen und aus ihm ohne nennenswerte Infektiositäts-Verluste die Viroid-RNS zu estrahieren. Der große Vorteil dieser Möglichkeit für die Viroid-Isolation braucht nicht besonders betont zu werden. Auf diese Weise kann außerdem die Viroid-Stammkultur in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt werden und schließlich ist es möglich, infizier-

tes Blattmaterial unter optimalen Bedingungen während der Sommermonate anzuziehen und in Tiefkühltruhen bis zur Extraktion aufzubewahren. Ein besonders geeignetes Verfahren für diese Methode wäre das Schockfrieren der Probe bei -85°C , wodurch es außerdem möglich ist, das glashart gefrorene Blattmaterial auf einfache Weise zu pulverisieren, was die anschließende Verarbeitung wesentlich erleichtert. Die Aufbewahrung der Blattproben über längere Zeit kann übrigens, ohne Verluste der Infektiosität, dann bei -25°C erfolgen.

Tab. 13: Einfluß des Tiefgefrierens und der Aufbewahrung bei -25°C auf die Infektiosität von ExCV- und PSTV-haltigen Blattproben

Viroid	Infektionserfolg ¹⁾					
	Blattprobe homogenisiert und sofort inokuliert			Blattprobe vor der Homogenisation und Inokulation für 24 Stunden tiefgefroren		
				aufbewahrt		
	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
ExCV	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	2/5
PSTV	10/10	10/10	6/10	10/10	10/10	4/10

1) Der Infektionserfolg ist angegeben als Quotient, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten Pflanzen und der Nenner die Zahl der inokulierten Pflanzen angibt.

4.9 Analyse von ExCV- und PSTV-haltigen Gesamt-RNS-Extrakten aus Pflanzengewebe durch Chromatographie auf Bio-Gel P-200

Aus der Fülle der zur Verfügung stehenden Materialien zur säulenchromatographischen Trennung von Nukleinsäuren wurde im Rahmen dieser Arbeit Bio-Gel P der BIO-RAD-Laboratories ausgewählt. Es handelt sich dabei um sphärische Polyacrylamid-Partikel, die biologisch inert sind und die nach einem speziellen Verfahren mit definierten Porengrößen hergestellt werden. Zur Auftrennung der Gesamt-RNS aus Viroid-infiziertem Pflanzengewebe wurde speziell Bio-Gel P-200 verwendet, weil mit ihm Moleküle mit einem Molekulargewicht von 30.000 bis 200.000 Dalton nach dem Prinzip des Molekularsiebverfahrens (sterische Ausschluß-Chromatographie) fraktioniert werden können. Da die Viroid-RNS ein Molekulargewicht um 100.000 Dalton hat, war mit der Möglichkeit einer Fraktionierung der Gesamt-RNS zu rechnen, wobei sich die Viroid-RNS über den Infektiositätstest einem spezifischen "peak" der optischen Dichte bei 254 nm zuordnen lassen sollte.

4.9.1 Chromatographie von ExCV-haltiger Gesamt-RNS aus Gynura

Das Ergebnis der chromatographischen Trennung von Gesamt-RNS aus ExCV-infiziertem Gynura-Gewebe auf Bio-Gel P-200 ist in Abb. 17 dargestellt. Man kann klar erkennen, daß im Ausschlußvolumen der Säule die sog. "hochmolekulare" Nukleinsäure als erste Hauptfraktion (Frakt. 15-35) erscheint. Der Infektiositätstest zeigt, daß die ExCV-RNS ebenfalls mit diesem "UV-peak" die Säule verläßt. Die elektrophoretische Analyse dieser sog. Viroid-Region ergab, daß sie sich vorwiegend aus 28s und 18s-ribosomaler RNS und um DNS zusammensetzt. Diese zellulären Nukleinsäuren sind auch für die hohe UV-Absorption verantwortlich.

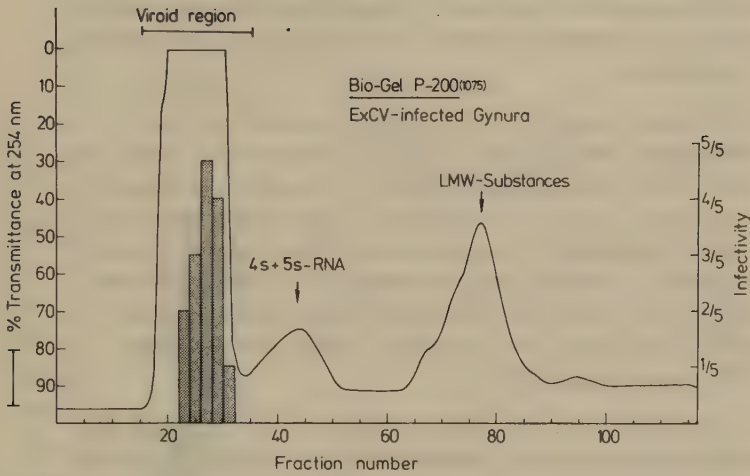


Abb. 17: Säulenchromatographische Auftrennung von ExCV-haltiger, Phenol-extrahierter Gesamt-Nukleinsäure aus Gynura auf Bio-Gel P-200. Der Infektiositäts-Test zeigt, daß die ExCV-RNS im Ausschlußvolumen dieser Säule (Fraktionen 22 bis 32) erscheint. Die Infektiosität ist als Quotient angegeben, wobei weitere Einzelheiten im Text. LMW = Substances = niedermolekulare Verunreinigungen.

Es muß betont werden, daß die Viroid-RNS in dieser Fraktion quantitativ nur einen verschwindend kleinen Anteil darstellt, dessen UV-Absorption praktisch nicht ins Gewicht fällt.

Als nächste Fraktion verlassen die 5s-RNS und die 4s-(=Transfer-)RNS in einem leicht verbreiterten "peak" die Säule. Schließlich folgen alle jene niedermolekularen Substanzen, wie z. B. Polyphenole und Polysaccharide, die als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe bei der Phenol-Extraktion der RNS aus dem Gewebe mitextrahiert werden und die in das Porenvolumen der Polyacrylamid-Körner eindringen können und so relativ lange auf der Säule zurückgehalten werden.

Dieser Versuch zeigt, daß es möglich ist, mit Hilfe der Säulenchromatographie niedermolekulare Verunreinigungen und die 4s- und 5s-RNS in einem Arbeitsgang von der Viroid-haltigen Fraktion abzutrennen. Leider ist diese Fraktion selbst jedoch noch immer ein Gemisch von mehreren Nukleinsäuren, von denen die beiden ribosomalen 18s- und 28s-RNS und die DNS die wichtigsten sind.

4.9.2 Chromatographie von PSTV-haltiger Gesamt-RNS aus Tomate

In Abb. 18 ist das Ergebnis der Auftrennung eines PSTV-haltigen Gesamt-Nukleinsäure-Präparates auf Bio-Gel P-200 dargestellt. Vergleicht man dieses Resultat mit dem der Fraktionierung der Nukleinsäure aus ExCV-infizierter Gynura, dann zeigt sich, daß hier im Prinzip das gleiche Ergebnis erhalten wurde. Die Auftrennung der 5s-RNS und der 4s-RNS in getrennten "peaks" kann man als einen für das Ziel des Versuchs an sich unwesentlichen Unterschied betrachten, der wohl mit der geringeren Beladung der Säule und der geringeren Konzentration niedermole-

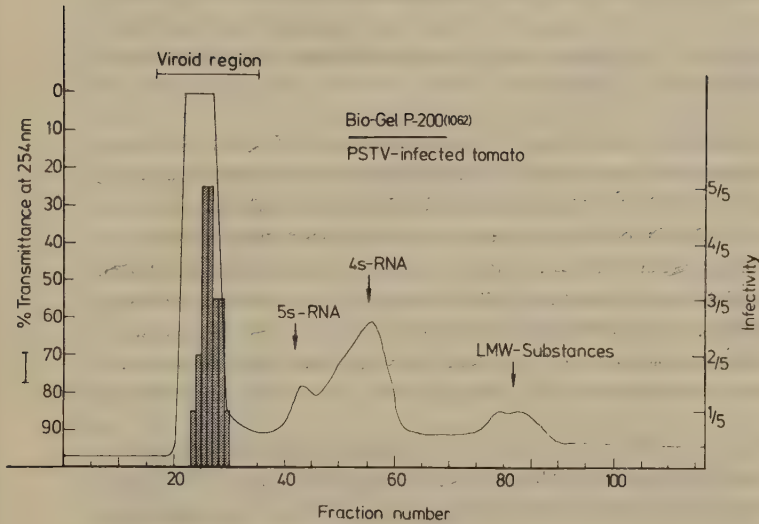


Abb. 18: Säulenchromatographische Auftrennung von PSTV-haltiger, Phenol-extrahierter Gesamtnukleinsäure aus Tomate auf Bio-Gel P-200. Der Infektiositäts-Test zeigt, daß die PSTV-RNS im Ausschlußort PSTV-Säule (Fraktionen 22 bis 32) erscheint. Die Infektiosität ist als Quotient angegeben, wobei der Zähler die Zahl der erkrankten Tomaten und der Nenner die Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen angibt. LMW-Substances = niedermolekulare Verunreinigungen.

kularer Verunreinigungen zusammenhängen dürfte. Rein äußerlich ist die Nukleinsäure-Probe aus Tomate heller und meist auch weniger viskos im Vergleich zu den sehr dunklen, Polyphenol-haltigen und Polysaccharid-reichen Präparaten aus Gynura.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß sich beide Viroide in ihrem Verhalten während der Chromatographie auf Bio-Gel P-200 prinzipiell gleich verhalten, d. h. daß sie in den gleichen Fraktionen des Säulen-Eluats erscheinen. Leider ist diese im Ausschlußvolumen erscheinende Fraktion höher-molekularer Nukleinsäuren immer ein Gemisch, das zu mehr als 98 % aus 18s- und 28s-ribosomaler RNS und DNS besteht, wie aus jüngsten Untersuchungen hervorgeht (SÄNGER und SINGH, unveröffentl.).

Daraus ergibt sich, daß zur weiteren Konzentrierung der Viroid-RNS und zu ihrer endgültigen Reinigung noch weitere Fraktionierungsschritte nötig sind. Als geeignete Verfahren bieten sich die verschiedenen Methoden der Absorptionschromatographie z. B. mit DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex an. Außerdem könnte auch die präparative Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zu diesem Zweck eingesetzt werden.

Es wird aus diesen Versuchen jedenfalls klar, daß es nicht möglich ist, mit einem einzigen Verfahren eine Konzentrierung und Reindarstellung der Viroid-RNS zu erreichen, sondern daß mehrere verschiedenartige Techniken in Kombination eingesetzt werden müssen.

4.10. Analyse der ExCV-haltigen RNS-Lösung auf einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel

Das Ergebnis der Analyse einer ExCV-haltigen RNS-Lösung aus Gynura im Vergleich zu einem RNS-Präparat aus gesunden Gynura-Blättern auf einem 5% Polyacrylamid-Gel ist in Abb. 19 dargestellt. Man kann aus dem Vergleich der unteren (infiziert) und mittleren (gesunde Kontrolle) UV-Absorptionskurven als erstes erkennen, daß bei der Auftrennung von RNS aus ExCV-haltigen und gesunden Gynura-Blättern praktisch keine Unterschiede im Absorptions-Profil auftreten. Da die gleiche Probenmenge aufgetragen wurde, bedeutet dies, daß die beiden Proben auch die gleiche Menge RNS enthalten müssen. An der Lage der "peaks", d.h. der Absorptions-Maxima kann man ersehen, daß in beiden Proben auch die Qualität der RNS fast identisch ist. Sie enthalten beide etwa die gleiche Menge 4s- (transfer) RNS und 5s-RNS, die beide im unteren Teil des Gels voneinander getrennt wurden. Das gleiche gilt für die hochmolekulare (16s-)RNS, die als kleinste ribosomale RNS-Art offenbar noch gerade in das 5% Gel eindringen kann.

Der entscheidende Unterschied zwischen beiden Gelen ergibt sich erst dann, wenn man die Gele durch Zerschneiden in Scheibchen fraktioniert und jedes einzelne Gelscheibchen nach dem Homogenisieren in Puffer zur Infektion von Testpflanzen benutzt. Es erweist sich nämlich, daß dieser Test nur mit Scheibchen des unteren Gels, auf dem die RNS aus ExCV-infizierten Gynura-Pflanzen getrennt wurde, ein positives Ergebnis liefert. Dieser Infektiositätstest zeigt, daß die ExCV-RNS unter den Bedingungen des Versuchs etwa in der Mitte des 5% Gels lokalisiert sein muß. Der Test des Gels mit RNS von gesunden Gynura-Blättern verlief negativ, so daß auf die Darstellung dieses Ergebnisses verzichtet werden konnte. Mit diesem Versuch läßt sich zeigen, daß trotz der sehr geringen und daher im Spektral-

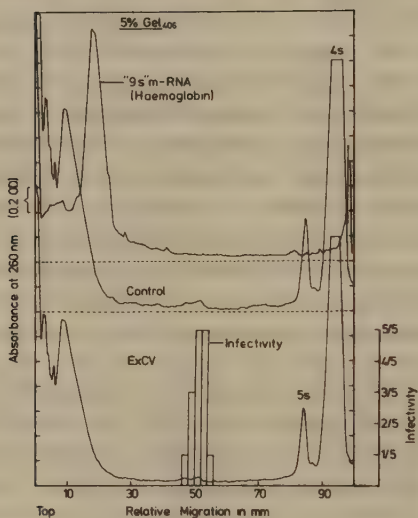


Abb. 19: Elektrophorese von RNS aus ExCV-infizierten und gesunden Gynura-Blättern in einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel.

Die "9s-Hämoglobin-messenger RNS" wurde neben den in den Proben selbst vorhandenen 4s- und 5s-RNS-Typen als eine Standard-RNS mit einem bekannten und gleichzeitig höheren Molekulargewicht verwendet.

photometer nicht nachweisbaren Konzentration der Viroid-RNS ihre eindeutige Lokalisation durch den biologischen Test möglich ist.

Vergleichbare Ergebnisse wurden erhalten, wenn die RNS aus PSTV-infizierten Tomaten unter den gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt, fraktioniert und die Gele in biologischen Tests auf die Lokalisation der PSTV-RNS getestet wurden. Der Vergleich ergab, daß beide Viroide ein völlig übereinstimmendes elektrophoretisches Verhalten zeigen, was auf eine Übereinstimmung in ihrer Größe hindeutet.

4.11. Die Bestimmung des Molekulargewichts der Viroid-RNS

Das Molekulargewicht einer beliebigen RNS läßt sich aus ihrer relativen Wanderungsgeschwindigkeit im Gel bestimmen, wenn man für diese Bestimmung RNS-Typen mit bekanntem und größenmäßig geeignetem Molekulargewicht als Standards verfügbar hat und diese bei der Elektrophorese mitlaufen läßt. Nach BISHOP et al., 1967 (18) besteht nämlich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der RNS in Polyacrylamid-Gelen.

Die relative Mobilität der Viroid-RNS konnte aus der Lage des Infektionsmaximums nach dem biologischen Test ermittelt werden. Für die 4s-RNS und die 5s-RNS, deren Molekulargewichte seit langem bekannt sind (4s-RNS = 25 000 Dalton; 5s-RNS = 36 000 Dalton), ließ sich die relative Wanderungsgeschwindigkeit aus der Lage der UV-"peaks" bestimmen. Als dritte Standard-RNS mit einem bekannten Molekulargewicht von 200 000 Dalton wurde die sog. "9s"-Hämoglobin-messenger-RNS verwendet (Abb. 19, obere Kurve), da sie ein höheres Molekulargewicht als Viroid-RNS hat und langsamer wandert. Mit dieser RNS als Standard erhält man einen dritten vom Molekulargewicht her gesicherten Wert auf dieser Bestimmungs-Kurve.

Die graphische Darstellung dieser durch Interpolation möglichen Molekulargewichtsbestimmung der Viroid-RNS zeigt Abb. 20. Man kann daraus ersehen, daß sich die drei Nukleinsäuren mit bekanntem Molekulargewicht in dieser halblogarithmischen Darstellung auf Grund ihrer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit auf einer Geraden anordnen lassen. Wenn man nun die in ihrem Molekulargewicht zu bestimmenden Viroid-Nukleinsäuren entsprechend der relativen Mobilität ihrer Infektiosität einträgt, dann ergibt sich, daß sie ein Molekulargewicht von etwa 85 000 Dalton haben müssen. Da das durchschnittliche Molekulargewicht eines Nukleotids etwa 330 Dalton beträgt, ergibt sich daraus eine Kettenlänge von etwa 250 Nukleotiden für die Viroid-RNS. Damit ist dieses infektiöse Molekül etwa dreimal so groß wie die kleinste funktionelle zelluläre RNS, die transfer-RNS. Diese Molekulargewichtsbestimmung weicht um etwa 30 % von früheren Bestimmungen ab (DIENER, 1972 (42), SÄNGER, 1972 (135)), was in erster Linie darauf zurückzuführen ist, daß mit der 9s-Hämoglobin-Boten-RNS eine Standard-RNS verwendet wurde, deren Molekulargewicht sehr genau bekannt ist und die vor allem größer als die Viroid-RNS ist.

In diesem Zusammenhang sollte allerdings darauf hingewiesen werden, daß im Rahmen dieser Arbeit der Einfluß der Sekundärstruktur der RNS bzw. ihre Konformation auf die relative Wanderungsgeschwindigkeit noch nicht berücksichtigt werden konnte. In letzter Zeit häufen sich die Hinweise, daß diese Parameter einen nicht unbedeutenden Einfluß auf das Verhalten der RNS im Gel haben. Daraus kann man ableiten, daß die bisherigen Molekulargewichtsbestimmungen, die auf der relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit beruhen, sicher noch weitere kleinere Korrekturen erfahren werden.

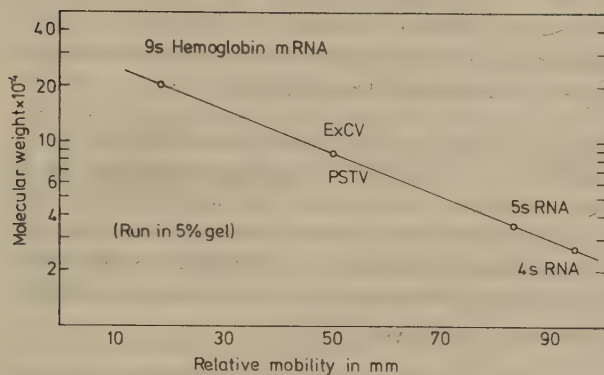


Abb. 20: Bestimmung des Molekulargewichts der infektiösen RNS des ExCV und des PSTV auf Grund ihrer relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit in einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel.

Dieses Ergebnis beruht auf dem in Abb. 19 dargestellten Gel-Lauf und den daraus ermittelten Werten.

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit diente der biologischen Charakterisierung der Erreger der Exocortis-Krankheit von Citrus (ExCV) und der Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV). Die im Verlauf dieser Untersuchungen durchgeführten Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Um eine möglichst optimale Inokulationsmethode für das ExCV auf der Testpflanze Gynura aurantiaca zu erreichen wurde der Einfluß von Zahl und Tiefe der Einstiche auf den Infektionserfolg ermittelt. Es ergab sich, daß 3 oder 4 senkrechte Einstiche in den Stengel mit dem sog. "Fakirbett" an der gleichen Stelle zu optimalen Ergebnissen führen.
- 2.) Im Hinblick auf den Inokulations-Ort erwies sich das obere krautige Drittel des Stengels als die geeignetste Stelle zur Erzielung optimaler Infektionserfolge.
- 3.) Ein Vergleich von drei verschiedenen Inokulationstechniken ergab, daß die Nadelstich-Inokulation mit dem "Fakirbett" sowohl der sog. "slash"-Inokulation dem Skalpell als auch der Inokulation durch Längsschnitte eindeutig überlegen ist.
- 4.) Bei der Suche nach krautigen Wirtspflanzen für das ExCV konnten aus rund 100 getesteten Arten lediglich die Solanaceen Scopolia lurida und Hyoscyamus niger und die Compositen Calendula officinalis und Guizotia abyssinica als neue Wirte gefunden werden.
- 5.) Der Wirtspflanzenkreis für das PSTV konnte um die Solanaceen Scopolia lurida, Solanum nigrum, Physochlaina orientalis und um drei Physalin-Arten (P. peruviana, P. floridiana und P. ixiocarpa) erweitert werden.

- 6.) Trotz intensivster Bemühungen gelang es leider nicht beide Viroide auf ihre heterologen Wirtspflanzen zu übertragen, d.h. Tomate erfolgreich mit ExCV und Gynura erfolgreich mit PSTV zu infizieren.
- 7.) Der Nachweis der Samenübertragbarkeit des ExCV ergab, daß bei Physalis floridiana im Durchschnitt etwa 33 % der Nachkommenschaft aus Samen kranker Pflanzen ebenfalls ExCV-infiziert ist. Bei Physalis floridiana beträgt dieser Wert 38 %.
- 8.) Die Bestimmung der Latenzzeit des ExCV in Gynura mit Hilfe des biologischen Tests ergab, daß das Agens frühestens 16 Tage nach der Infektion nachweisbar ist.
- 9.) Die Bestimmung der Latenzzeit für das PSTV in Tomate mit einem besonders empfindlichen Testverfahren zeigte hingegen, daß das PSTV bereits 2 Tage nach der Infektion im Wirt nachgewiesen werden kann.
- 10.) Der Infektionstest von Blättern verschiedener Arten aus ExCV-infizierten Gynurapflanzen 4 Wochen nach der Infektion ergab, daß sich das Agens nur in denjenigen Blättern vermehrt und ausbreitet, die zur Zeit der Inokulation als Blattprimordien angelegt sind.
- 11.) Die Versuche zur Erhöhung des Infektionserfolges durch den Zusatz von Dimethylsulfoxyd und DEAE-Dextran zum Inokulum ergaben, daß diese an sich vielversprechende Zusätze keinen fördernden Einfluß auf den Infektionsvorgang beider Viroide haben.
- 12.) Die Bestimmung des Verdünnungsendpunktes (VEP) beider Viroide ergab, daß der VEP des ExCV in Gynura-Blatthomogenisaten bei 10^{-5} liegt, während er für das PSTV in Blatthomogenisaten von Tomate bei 10^{-7} liegt.

- 14.) Viroidhaltiges Blattmaterial kann ohne einen nennenswerten Verlust seiner Infektiosität tiefgefroren aufbewahrt werden, so daß man zur Reindarstellung der Viroide nicht unbedingt von frischem Material auszugehen braucht, sondern auf Material aus der Tiefkühltruhe zurückgreifen kann.
- 15.) Die Analyse von ExCV und PSTV-haltigen Gesamt-RNS-Extrakten aus Pflanzengewebe durch Molekularsieb-Chromatographie auf Bio-Gel P-200 ergab, daß die Viroid-RNS zwar von der pflanzeigenen 4s-RNS oder 5s-RNS niedermolekularen Verunreinigungen getrennt werden kann. Es ist aber mit diesem Verfahren nicht möglich, sie von der höhermolekularen ribosomalen RNS und der DNS abzutrennen.
- 16.) Die Analyse einer ExCV-haltigen RNS-Lösung aus Gynura auf einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel zeigte im Vergleich zur gesunden Kontrolle keinen Unterschied im Absorptionsprofil bei 260 nm. Durch den Infektiositätstest konnte jedoch gezeigt werden, daß die Viroid-RNA etwa in der Mitte des Gels lokalisiert war.
- 17.) Die Bestimmung der Molekulargewichte beider Viroide auf Grund ihrer relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit ergab einen Wert von 85 000 Dalton, was einer Kettenlänge dieser infektiösen RNS von etwa 250 Nucleotiden entspricht.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALTENBURG, E.: The "viroid" theory in relation to plasmagenes, viruses, cancer, and plastids
Amer. Natur. 80: 559-567, 1946
2. ALLEN, R.M.; ODEN, W.R.: Variability of seedlings clones of citron as indicator of exocortis virus of citrus
Phytopathology 54: 1431, 1964
3. ALLEN, R.M.: Mechanical transmission of exocortis virus
Citograph 55: 145-148, 1970
4. ALLEN, R.M.: Survival time of exocortis virus of citrus on contaminated knife blades
Plant Dis.Reptr. 52: 935-939, 1968
5. ALLINGTON, W.B.; BALL, E.M.; GALVEZ, G.: Potato spindle tuber caused by a strain of potatovirus X
Plant Dis. Reprtr. 48: 597-598, 1964
6. BALL, E.M.; ALLINGTON, W.B.; GALVEZ, G.E.: Serological studies of a virus that produces spindle tuber in potatoes
Phytopathology 54: 887, 1964
7. BALD, J.G.; NORRIS, D.O.; DICKSON, B.T.: The shape and development of potato tubers, and their significance in the diagnosis of spindle tuber
Phytopathology 31: 181-186, 1941
8. BAGNALL, R.H.: Serology of potato spindle tuber virus
Phytopathology 57: 533-544, 1967
9. BANFI, A.: El pie trifollio
Idia, Nos. 106/8: 170-171, 1956
10. DELLAMY, A.R.; RALPH, R.K.: Recovery and purification of nucleic acid by means of cetyl-trimethylammonium bromide
Methods Enzymol. 12: 156-160, 1968
11. BENTON, R.J.; BOWMAN, F.T., FRASER, L.; KEBBY, R.G.: Stunting and scaly butt of citrus - Associated with Poncirus trifoliata root-stocks
The Agric. Gaz. of N.S.W. LX: 641-645, 1949

12. BENTON, R.J.; BOWMAN, F.T., FRASER, L.; KEBBY, R.G.:
Selection of citrus budwood to control
scaly butt in Trifoliata rootstock
The Agric. Gaz. of N.S.W. LX: 31-34, 1949
13. BENTON, R.J.; BOWMAN, F.T., FRASER, L.; KEBBY, R.G.:
Scaly butt of trifoliata - Need for
certified buds for all citrus on this
stock
The Agric. Gaz. of N.S.W. LX: 475, 1945
14. BENTON, R.J.; BOWMAN, F.T., FRASER, L.; KEBBY, R.G.:
Stunting and scaly butt of citrus -
Associated with Poncirus trifoliata root-
stocks
The Agric. Gaz. of N.S.W. LX: 521-526, 1949
15. BENTON, R.J.; BOWMAN, F.T.; FRASER, L.; KEBBY, R.G.:
Stunting and scaly butt of citrus -
Associated with Poncirus trifoliata
rootstocks
The Agric. Gaz. of N.S.W. LX: 577-582,
1949
16. BITTERS, W.P.: Exocortis disease of citrus.
Calif. Agric. 6: 5-6, 1952
17. BITTERS, W.P.; BRUSCA, J.B.; DUKESHIRE, N.W.:
Effect of lemon budwood in transmission
of exocortis
Citrus leaves 34: 8-9, 1954
18. BISHOP, D.H.L.; CLAYBROOK, J.R.; SPIEGELMAN, S.:
Electrophoretic separation of viral
nucleic acids on polyacrylamidegels
J. Mol. Biol. 26: 373-387, 1967
19. BRAKKE, M.K.; VAN PELT, N.: Linear log gradients for
estimating sedimentation coefficients
of plant viruses and nucleic acids.
Anal. Biochem. 38: 56-64, 1970
20. BROADBENT, P.; FRASER, L.R.; LONG, J.K.:
Exocortis virus in dwarfed citrus trees
Plant Dis. Repr. 55: 998-999, 1971
21. BRUNO, A.: Citrus virus symptoms in Sardinia
Nature 202: 932, 1964
22. BRZESKI, M.W.: Nematodes associated with citrus trees
infected by four viruses and comments
about nematode distribution in Florida
citrus groves
Plant Dis. Repr. 49: 610-614, 1965

23. BONDE, R.: The spread of spindle tuber by the knife.
Am. Potato J. 4: 51-52, 1927
24. BONDE, R.; MERRIAM, D.: Studies on the dissemination
of the potato spindle tuber virus by
mechanical inoculation
Am. Potato J. 28: 558-560, 1951
25. BOVE, J.M.; VOGEL, R.: The state of health of Citrus
in Corsica: III. Shell bark of lemon
trees.
Fruits d'Outre Mer 17: 351-356, 1962
26. CALAVAN, E.C.; FROLICH, E.F., CARPENTER, J.B.;
ROISTACHER, C.N.; CHRISTIANSEN, D.W.:
Rapid indexing for exocortis of citrus
Phytopathology 54: 1359-1362, 1964
27. CALAVAN, E.C.; FROLICH, E.F.; CARPENTER, J.B.;
ROISTACHER, C.N.; CHRISTIANSEN, D.W.:
Rapid detection of exocortis in citrus
Calif. Agric. 19: 8-10, 1965
28. CALAVAN, E.C.; WEATHERS, L.G.: Report on exocortis,
major disease of citrus
Calif. Citrogr. 49: 83-84, 1963
29. CALAVAN, E.C.; SOOST, R.K.; CAMERON, J.W.:
Exocortis-like symptoms on unbudded
seedlings and rootstocks of Poncirus
trifoliata with seedlings-line
tops, and probable spread of exocortis
in a nursery
Plant Dis. Repr. 43: 374-379, 1959
30. CALAVAN, E.C., WEATHERS, L.G.; CHRISTIANSEN, D.W.:
Effect of exocortis on the production
and growth of Valencia orange trees
on trifoliolate orange rootstocks
Proc. 4th Conf. int. Organiz. Citrus
Virol. 101-104, 1968
31. CATARA, B.: La "exocortite" degli agrumi in Sicilia
Tech. agric. 18: 187-196, 1966
32. CHILDS, J.F.L.; KNORR, L.C.: Control of virus diseases
of citrus trees - an evaluation of
methods
Phytopathology 55: 675-680, 1965
33. CHILDS, J.F.L., NORMAN, G.G., EICHHORN, J.L.:
Early diagnosis of exocortis infection
in Poncirus trifoliata by laboratory
test
Proc. Conf. Citrus Virus Dis. Calif.
155-151, 1957/59

34. CHILDS, J.F.L., NORMAN, G.G., EICHHORN, J.L.:
A color test for exocortis infection
in *Poncirus trifoliata*
Phytopathology 48: 426-432, 1958
35. COHEN, M.: Exocortis virus as a possible factor
in producing dwarf citrus trees
Proc. Fla. St. hort. Soc. 81: 115-119,
1969
36. DIANZANI, F.; BARON, S.; BUCKLER, C.E.:
A sensitive assay for infectivity of
Mengo-virus RNS in L cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125: 292-294,
1967
37. DIENER, T.O.: Potato spindle tuber virus: In situ sen-
sitivity of the infectious agent to ri-
bonuclease
Phytopathology 58: 1048, 1968
38. DIENER, T.O.: Isolation of exonuclease resistant
ribonucleic acid from healthy and
potato spindle tuber virus-infected toma-
to leaves
Phytopathology 60: 1014, 1970
39. DIENER, T.O.: Circular ribonucleic acid in healthy
and potato spindle tuber virus-infec-
ted tomato tissue
Phytopathology 60: 1289, 1970
40. DIENER, T.O.: Potato spindle tuber viroid VIII Correla-
tion of infectivity with a UV-Absorbing
component and thermaldenaturation
properties on the RNS
Virology 50: 606-609, 1972
41. DIENER, T.O.: Potato spindle tuber virus: A plant
virus with properties of a free nucleic,
acid III. Subcellular location of PSTV
RNA and the question of whether virions
exist in extracts or in situ
Virology 43: 75-89, 1971
42. DIENER, T.O.: Potato spindle tuber "virus": IV A repli-
cating low molecular weight RNA
Virology 45: 411-428, 1971
43. DIENER, T.O.: Virus Terminology and the Viroid:
A Rebuttal
Phytopathology 63: 1328-1329, 1973
44. DIENER, T.O.: Viroids
Adv. Virus Res. 17: 295-312, 1972

45. DIENER, T.O.; RAYMER, W.B.: Potato spindle tuber virus a plant virus with properties of a free nucleic acid
Science 158: 378-381, 1967
46. DIENER, T.O., RAYMER, W.B.: Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. II Characterization and partial purification
Virology 37: 351-366, 1969
47. DIENER, T.O.; SMITH, D.R.: Potato spindle tuber viroid. VI Monodisperse distribution after electrophoresis in 20 % polyacrilamide gels
Virology 46: 498-499, 1971
48. DIENER, T.O.; SMITH, D.R.; O'BRIEN, M.J.: Potato spindle tuber viroid. VII Susceptibility of several solanaceous plant species to infection with low molecular-weight RNS
Virology 48: 844-846, 1972
49. DIENER, T.O.; LAWSON, R.H.: Chrysanthemum stunt: A viroid disease
Virology 51: 94-101, 1973
50. DU CHARME, E.P.; KNORR, C.C.: Relation between Argentina's lepra explosiva and Florida's scally bark of citrus
Phytopathology 40: 7, 1950
51. DUNN, D.B.; HITCHBORN, J.H.: The use of bentonite in the purification of plant viruses
Virology 25: 171-192, 1965
52. DETERMANN, H.: Gelchromatographie: II. Kapitel - Praxis der Gelchromatographie 14-64
Springer-Verlag 1967
53. DORSTVAN, H.J.N.; PETERS, D.: Neth.Jour. Plant. Pathology (in Vorbereitung, 1973)
54. EASTON, G.D.; MERRIAM, D.C.: Mechanical inoculation of potato spindle tuber virus in the genus Solanum
Phytopathology 53: 349, 1963
55. E.P.P.O. (European and Mediterranean Plant Protection Organization): Report of the international conference on virus diseases of citrus
(Publ.) EPPO 103, 1960
- 55a. FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B.; TSUGITA, A.: Purification of viral RNA by means of bentonite. Virology 14: 54-58, 1961

56. ELSAID, H.M.; SINCLAIR, J.B.: Use of strains and pathological histology to detect virus infection in citrus
Phytopathology 55: 543-545, 1965
57. FAWCETT, H.S.; KLOTZ, L.J.: Bark shelling of trifoliolate orange
Calif. citrogr. 33: 230, 1948
58. FELDMAN, A.W.; HANKS, R.W.: Identification and quantification of phenolics in the leaves and roots of healthy and exocortis infected citrus.
292-299. In J.F.L. Childs (ed.) 4th Conf. Int. Organ Citrus. Virol. Proc. Univ. Fla. Press, Gainesville, 1968
59. FELDMAN, A.W.; BRIDGE, G.D.; HANKS, R.W., BURNETT, H.C.: Effectiveness of chromatographic method for detecting exocortis virus infection in Poncirus trifoliata.
Phytopathology 61: 1338-1341, 1971
60. FERNOW, K.H.: Spindling tuber or marginal leafroll
Phytopathology 13: 40, 1929
61. FERNOW, K.H.: Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus.
Phytopathology 57: 1347-1352, 1967
62. FRASER, L.R.; LEVITT, E.C.: Recent advances in the study of exocortis (scally butt) in Australia
129-133, In J.M. Wallace (ed.) Proc. Conf. Citrus Virus disease, Riverside, Calif. 1957
63. FRISCH-NIGGEMEYER, W.: Virusreinigung durch Ausschluß-chromatographie mit porösem Glas.
Zentr. für Bakt. 230: 306-308. 1972
64. FOGUET, J.L.; OSTE, C.A.: Disorders of trifoliolate orange rootstocks in Tucuman (RA).
Proc. 4th Conf. Int. Organiz. Citrusvirol. 183-189, 1968
65. FULDL-ALLAH, A.; CALAVAN, E.C., DESJARDINS, P.R.: Comparative anatomy of healthy and exocortis virus-infected citron plants.
Phytopathology 61: 990-993, 1971
66. GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J.: Degenerative neurological diseases of viral etiology: Scrapie, Kuru and Creutzfeld-Jacob disease.
In Proc. Conf. Atypical Virus Infection, eds. Christian, Phillips, and Williams, pp. 167-177, 1971

67. GARDNER, F.E.: Growth and productivity of virus infected Valencia orange trees on twenty-five rootstocks
Proc. Fla. St. hort. Soc. 80: 89-92, 1967
68. GARNSEY, S.M.; JONES, J.W.: Mechanical transmission of exocortis virus with contaminated budding tools
Plant Dis. Reprtr. 51: 410-413, 1967
69. GARNSEY, S.M.; WHIDDEN, R.: Transmission of exocortis virus to various citrus plants by knife-cut inoculation
Phytopathology 60: 1292, 1970
70. GARNSEY, S.M.: Exocortis virus of citrus can be spread by contaminated tools.
Citrus Ind. 49: 13-16, 1968
71. GSCHWENDER, H.H.; HALLER, W.; HOFSCHEIDER, P.H.: Large scale preparation of viruses by steric chromatography on columns of controlled poreglas
Biochim. Biophys. Acta 190: 460-469, 1969
72. GOSS, R.W.: Transmission of potato spindle-tuber by cutting knives and seed piece contact
Phytopathology 16: 299-303, 1926
73. GOSS, R.W.: Transmission of potato spindle tuber by grasshoppers (Locustidae)
Phytopathology 18: 445-448, 1928
74. HALLER, W.: Chromatography on glass of controlled pore size
Nature 208: 693-696, 1965
75. HANAFUSA, H.: Methods in Virology VOL IV Chap. 7: Methods for the study of defective viruses
Acad. Press. 321-348, 1968
76. HJERTEN, S.: Arch. Biochim. Biophys. Suppl. 1: 147 ff., 1962
77. HOLMES, F.O.: Trends in the development of plant virology
Ann. Rev. of Phytopathology 16: 41-62, 1968
78. HOSEIN, I.: Exocortis in ortanique orange.
Plant Dis. Reprtr. 52: 741-743, 1968

79. HUNTER, J.E.; DARLING, H.M.; BEALE, W.L.:
Seed transmission of potato spindle
tuber virus.
Amer. Potato J. 46: 247-250, 1969
80. HUNTER, J.E.; RICH, A.E.: Liquid nitrogen as an
aid in studying potato spindle tuber
virus
Phytopathology 54: 488, 1964
81. HUNTER, J.E.; RICH, A.E.: Some factors affecting the
transmission and stability of potato spindle
tuber virus
Phytopathology 59: 128, 1964
82. JAMOUCSI, B.: Les viroses de Citrus en Tunisie et
le moyens de lutte
Ann. Inst. nat. Rech. agron. Tunisie 39:
1-59, 1966
83. JONES, W.; RAWLINS, T.E.: Influence of spindle-tuber
disease on the physiology of the potato
tuber
Phytopathology 19: 1137, 1929
84. KAPUR, J.P.; WEATHERS, L.G.: Some metabolic changes
in *Lycopersicon esculentum* plants in-
fected with potato spindle tuber virus
Phytopathology 61: 1322, 1971
85. KAPUR, S.P.; WEATHERS, L.G.; CALAVAN, E.C.:
Studies on the mechanical transmission,
extraction, and assay of the citrus
exocortis virus in *Gynura aurantiaca*
Phytopathology 60: 1535, 1970
86. KAPUR, S.P.; WEATHERS, L.G.: Studies on the extraction
and mechanical transmission of citrus
exocortis pathogen in *Gynura*
Plant. Dis. Repr. 57: 598-600, 1973
87. KEGLER, H.: Im Pflanzliche Virologie Band II, Seite
332-333. Die Virosen des europäischen
Raumes. M. Klinkowski, Akademie-Verlag.
Berlin 1968
88. KISCH, A.L.: Dimethyl Sulfoxide enhancement of trans-
formation by Polyoma Virus
Virology 37: 32-41, 1969
89. KLINKOWSKI, M.: Die Spindelknollenkrankheit - O. Bonde
in Pflanzliche Virologie Band II Teil 1,
57-58, 1968, Akademie-Verlag, Berlin

90. KING, A.; CASPAR, D.L.D.: The structure of small viruses
Adv. in Virus Res. 7: 225, 1960
91. KNORR, L.C.; DU CHARME, E.P.; BUSBY, J.N.:
Discovery of exocortis in Florida citrus
Plant Dis. Repr. 38: 12-13, 1954
92. KNORR, L.C.; DU CHARME, E.P.; BANFI, A.:
La exocortis en los montes citricos de
la Argentina
Idia 45: 8-12, 1951
93. KRAAIJENGA, D.A.: Citrus research in Surinam in conec-
tion with tristeza and other virus
disease
Surinaam. landb. 12: 50-56, 1964
94. KÖHLER, E.; KLINKOWSKI, M.: Handbuch der Pflanzen-
krankheiten Band II: Viruskrankheiten -
Die Viroten der Citrusarten.
Paul Parey, 493-494, 1954
95. LAIRD, E.F.; HARJUNG, M.K.; WEATHERS, L.G.:
Attempts to transmit citrus exocortis
virus by insects
Plant Dis. Repr. 53: 850, 1969
96. LEAKE, C.D.: Dimethylsulfoxide
Science 152: 1646-1649, 1966
97. LEBERMAN, R.: The isolation of plant viruses by means
of simple coacervates
Virology 30: 341-347, 1966
98. LEE, C.R.; SINGH, R.P.: Enhancement of diagnostic
symptoms of potato spindle tuber virus
by manganese
Phytopathology 61: 900, 1971
99. LOENING, V.E.; INGLE, J.: Diversity of RNS components
in green plant tissues
Nature 215: 363-367, 1967
100. MAES, R.; SEDWICK, W.; VAHERI, A.: Interaction between
DEAE-dextran and nucleic acids.
Biochim., Biophys. Acta: 134: 269-276,
1967
101. MAURER, H.R.: Disk-Electrophorese.
Walter de Gruyter u. Co. 1-181, 1968
102. MAJORANA, G.: Preliminary results of the transmission
of exocortis to the citron variety Etrog
60-13
Phytopath. medit. 5: 61-63, 1966

103. MANZER, F.E.; MERRIAM, D.: Field transmission of the potato spindle tuber virus and virus X by cultivating and hilling equipment
Amer. Potato J. 38: 346-352, 1961
104. MARTIN, W.H.: Spindle tuber a new potato trouble hints to potato growers
New Jersey State Potato Ass. 3: 8, 1922
105. MAC LACHLAN, D.S.: Potato Spindle tuber in eastern Canada
Amer. Potato J. 37: 13-17, 1960
106. MENDEL, K.: New concepts in stionic relations of citrus
Proc. 1st Int. Citrus Symp. Riverside, 1: 422-423, 1962
107. MERRIAM, D.; BONDE, R.: Dissemination of spindle tuber by contaminated tractor wheels and by foliage contact with diseased plants
Phytopathology 44: 111, 1954
108. Mc KINNEY, H.H.: Comments on Virus Terminology and the "Viroid"
Phytopathology 63: 438, 1973
109. Mc BUELLY, C.W.: A study of potato spindle tuber by paper chromatography
Phytopathology 47: 23, 1957
110. MOREIRA, S.: Um rapido teste de campo para exocorte
Bragantia 22: 417-422, 1963
111. MOREIRA, S.: Sintomas de "exocortis" em limoneiro cravo
Bragantia 14: 14-16, 1955
112. MOREIRA, S.: Amolêstia "exocortis" eo cavolo de limoneiro cravo
Rev. Agr. (Piracicaba) 30: 99-112, 1955
113. MARIANI, T.K.; RAYCHANDHURI, S.P.; SHARMA, B.C.: Exocortis in citrus in India.
Plant Dis. Repr. 52: 834, 1968
114. NIGH, E.L.; ALLEN, R.M.: Failure of nematodes to transmit citrus exocortis virus
Phytopathology 57: 100, 1967
115. NOUR-EL-DIN, F.; TOLBA, M.A.: Presence of citrus exocortis virus disease in U.A.R.
Agric. Res. Rev. Cairo 45: 110-113, 1967

116. O'BRIEN, M.J.; RAYMER, W.B.: Symptomless host of the potato spindle tuber virus
Phytopathology 53: 884, 1963
117. O'BRIEN, M.J.; RAYMER, W.B.: Symptomless host of potato spindle tuber virus
Phytopathology 54: 1045-1047, 1964
118. OLSON, E.D.; SHULL, A.V.: Size and yield of 12-years-old Valencia orange trees on various rootstocks in presence of exocortis and xyloporosis virus.
J. Rio Grande Valley hort. Sci. 16: 40-43, 1962
119. OLSON, E.O., SLEET, B.; SHULL, A.V.: Prevalence of virus causing xyloporosis (cachexia) and exocortis (Rangpur-lime disease) in apparently healthy citrus trees in Texas
J. Rio Grande Valley hort Inst. 12: 35-43, 1958
120. ÖZALP, M.O.; AZERI, T.: Virus disease survey on citrus in the Aegean region
Key. Turk. Sci. Agric. 1: 167-187, 1968
121. PAGANO, J.S.; VAHERI, A.: Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D)
Arch. Gesamte Virusforsch. 17: 456-464, 1965
122. PINE, T.S.: Reactions of peach trees and peach tree Viruses to treatment with Dimethylsulfoxide and other chemicals
Phytopathology 57: 671-673, 1967
123. RAYMER, W.B.; O'BRIEN, M.J.: Transmission of potato spindle tuber virus to tomato
Amer. Potato J. 39: 401-408, 1962
124. RAYMER, W.B.; DIENER, T.O.: Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. I Assay, extraction, and concentration
Virology 37: 343-350, 1969
125. REINKING, O.: Phillipinesplant diseases
c Phytopathology 9: 114-140, 1919
126. REITZ, H.J.; KNORR, L.C.: Occurrence of Rangpur lime disease in Florida and its concurrence with exocortis
Plant Dis. Repr. 41: 235-240, 1957

127. RODRIGUEZ, O.S.: Sintomas de enfermedades virosas en el portainjerto limadulce de Persia en la zona de Bella Vista, Corrientes Idia 191: 43-48, 1963
128. ROISTACHER, C.N.; BLUE, R.L.; CALAVAN, C.E.: Preventig transmission of exocortis virus Calif. Citroxr. 54: 91, 1969
129. ROISTACHER, C.N.; CALAVAN, E.C.; BLUE, R.L.: Citrus exocortis virus-chemical inactivation on tools, tolerance to heat and separation of isolates Plant Dis. Reptr. 53: 333-336, 1969
130. ROISTACHER, C.N.; MAURER, E.M.; WALLACE, J.M.; DRAKE, R.J.: Incidence of viruses incitrus budwood introduced into USA from foreignn countries. Phytopathology 57: 101, 1967
131. ROSSETTI, V.: Biochemical modifications in the bark of various citrus plants affected by exocortis Fruits d'Outre Mer 17: 533-544, 1962
132. ROSSETTI, V.; NAKADAIRIO, J.T.; CALZA, R.: Observations of citrus diseases and pests in the coastal regions of Argentina and Uruguay Biologico 31: 203-215, 1965
133. SALIBE, A.: Contribucao ao estudo da doenca exocorte dos citrus Thesis, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Univ. de Sao Paulo, 71 p., 1961
134. SALIBE, A.: Reaction of citrus types to exocortis Proc. 16th int. Kort. Congr. Brussels, 1: 422-423, 1962
135. SÄNGER, H.L.: An Infectious and replicating RNA of Low Molecular Weight: The agent of the Exocortis Disease of citrus Adv. in the Biosc 8: 103-116, 1972
136. SÄNGER, H.L.: Viroids- In Sixth Harden Conference, Wye College, Ashford, 1973
137. SÄNGER, H.L.: Untersuchungen über die beiden charakteristischen Partikel des Ratelvirus und das serologische Verhalten verschiedener Isolate Dissertation - Gießen, 106 Seiten, 1960

138. SÄNGER, H.L.: "Naked" plant viruses. Abstracts of the X. Int. Conf. for Microbiology, Mexico, 238, 1970
139. SÄNGER, H.L.: Defective Plant Viruses in H.G. Wittmann and H. Schuster (ed.) Molecular Genetics 4. Wiss. Konf. Ges. Deutsche Naturforschung Ärzte, Berlin Springer-Verlag, 300-336, 1968
140. SÄNGER, H.L.: Extraktion von Gesamt-Nukleinsäure aus tiefgefrorenem gepulvertem Pflanzenmaterial
13 S. 1973 (Unpublished)
141. SÄNGER, H.L.; BRANDENBURG, E.: Über die Gewinnung von Infektiösem Pflanzensaft aus "Wintertyp"-Pflanzen des Tabak rattle-Virus durch Phenolextraktion
Naturwissenschaften 48: 391, 1961
142. SÄNGER, H.L.; GOLD, C.A.: Action of actinomycin D on RNA synthesis in healthy and virus-infected tobacco leaves
Biochem. Biophys. Res. Com. 13: 455-461, 1963
143. SÄNGER, H.L.; GOLD, C.A.: Transmission of unstable viruses from liquid-nitrogen-frozen plant tissue
Phytopathology 52: 750, 1962
144. SÄNGER, H.L.; RAMM, K.; MUTH, H.: Improved transmission of the viroid of Exocortis of citrus by a new needle puncture procedure (In Vorbereitung 1973)
145. SCHULTZ, E.S.; FOLSOM, D.: Spindling-tuber and other degeneration diseases of Irish potatoes
Phytopathology 13: 40, 1923
146. SCHULTZ, E.S.; CLARK, C.F.; BONDE, R.; RALEIGH, W.P.; STEVENSON, F.J.: Resistance of potato to mosaic and other virus diseases
Phytopathology 24: 116-132, 1934
147. SCOTT, H.A.; BOZOCEVICH, J.; VINCENT, M.M.: Bentonite flocculation: A rapid sensitive serological test for the detection of plant virus antigens
Phytopathology 55: 889, 1963

148. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Exocortis Virus:
An infectious free-nucleic acid
plant virus with unusual properties
Virology 47: 456-466, 1972
149. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Exocortis disease:
Evidence for new species of "infectious"
low molecular weight RNA in plants.
Nature 237: 242-244, 1972
150. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Pathogenic 10 S RNA
from Exocortis disease recovered from
tomato bunchy-top plants similar to
potato spindle tuber virus infection
Virology 49: 622-625, 1972
151. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Evidence for an infec-
tious double-stranded RNA plant virus
Phytopathology 61: 910, 1971
152. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Multiple infectious
forms of a free-RNA plant virus
Phytopathology 60: 1313, 1970
153. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Properties of the
infectious forms of exocortis virus
of citrus
Phytopathology 60: 732-736, 1970
154. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Characterization of
infectious nucleic acid associated with
infection by exocortis virus of citrus
Phytopathology 58: 1067, 1968
155. SEMANCIK, J.S.; WEATHERS, L.G.: Exocortis virus of
citrus: Association of infectivity with
nucleic acid preparations
Virology 36: 326-328, 1968
156. SIBILIA, C.: Citrus viruses: how to avoid these
diseases
Ital. agric. 100: 25-31, 1963
157. SIBILIA, C.; TARSIA, N.: Preliminary biochemical
studies on orange juice from trees
affected by exocortis
BSU. Staz. Pat. Veg. Roma 20: 201-205,
1962
158. SINGH, R.P.: Occurrence, symptoms, and diagnostic host
of strains of potato spindle tuber virus
Phytopathology 60: 1314, 1970

159. SINGH, R.P.: Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato
Amer. Potatos 47: 225-227, 1970
160. SINGH, R.P.: A local lesion host for potato spindle tuber virus.
Phytopathology 61: 1034-1035, 1971
161. SINGH, R.P.; BAGNALL, R.H.: Infectious nucleic acid from host tissue infected with the potato spindle tuber virus
Phytopathology 58: 696-699, 1968
162. SINGH, R.P.; BENSON, D. P.; SALAMA, F.M.: Purification and electron microscopy of potato spindle tuber virus
Phytopathology 56: 901-902, 1966
163. SINGH, R.P.; CLARK, M.C.: Infections Low-Molecular weight robonucleic acid from Tomato
Biochem. Biophys. Res. Comm. 44: 1077-1083, 1971
164. SINGH, R.P.; MC CLARK:
Nature of the 3'-Terminus and Molecular size of spindle tuber metavirus
Abstr. 0282, 2nd International Congress of Plant Pathology, Minneapolis (Minnesota) 1973
165. SINCLAIR, J.B.; BROWN, R.T.: Effect of exocortis on Satsuma orange
Phytopathology 52: 581-582, 1962
166. SINCLAIR, J.B.; BROWN, R.T.: Effect of exocortis disease on four citrus rootstocks
Plant Dis. Repr. 44: 180-183, 1960
167. SIMMONDS, J.W.; HALLIWELL, R.S.: Identification of plant nucleic acids utilizing selected area electron diffraction
Phytopathology 60: 588, 1970
168. SLEETH, B.: Effect of exocortis and xyloporosis viruses on growth of nucellar grapefruit on different rootstocks
J. Rio Grande Valley hort. Soc. 17: 108-111, 1963
169. SMITH, K.M.: A Textbook of plant virus disease.
Potato spindle tuber virus
Little, Brown Co. Boston: 376-377, 1956

170. STACE-SMITH, R.; MELLOR, F.C.: Eradication of potato spindle tuber virus by thermotherapy and axillary bud culture
Phytopathology 60: 1857-1858, 1970
171. STOLLAR, B.D.; DIENER, T.O.: Potato spindle tuber virus: V. Failure of immunological tests to disclose double-stranded RNA or RNA-DNA hybrids
Virology 46: 168-170, 1971
172. TANAKA, S.: A color test for citrus exocortis in Japan
Ann. phytopath. Soc. Japan 34: 151-152, 1968
173. WALLACE, J.M.: Virus diseases in South African citrus orchards
Citrus Gr. 325: 7-15, 1961
174. WARDEN, D.; THORNE, H.V.: Influence of diethylaminothyl-dextran on uptake and degradation of polyoma virus deoxyribonucleic acid by mouse embryo cells
J. Virol. 4: 380-387, 1969
175. WEATHERS, L.G.: The effect of host nutrition on the development of exocortis in Poncirus trifoliata
Phytopathology 50: 87, 1960
176. WEATHERS, L.G.: Transmission of exocortis virus of citrus by Cuscuta subinclusa
Plant Dis. Repr. 49: 189-190, 1965
177. WEATHERS, L.G.: Petunia an herbaceous host of exocortis virus of citrus
Phytopathology 55: 1081, 1965
178. WEATHERS, L.G.: Nitrogen as a factor in the development of exocortis of citrus
Phytopathology 54: 968-969, 1964
179. WEATHERS, L.G.; CALAVAN, E.C.: Additional indicator plants for exocortis and evidence for strain differences in the virus
Phytopathology 51: 262-264, 1961
180. WEATHERS, L.G.; GREER, F.C.: Additional herbaceous host of the exocortis virus of citrus
Phytopathology 58: 1071, 1968

181. WEATHERS, L.G.; GREER, F.C.; HARJUNG, M.K.:
Transmission of exocortis virus of
citrus to herbaceous plants
Plant Dis. Reprtr. 51: 868-871, 1967
182. WEATHERS, L.G.; HARJUNG, M.K.: Transmission of citrus
viruses by dodder, *Cuscuta subinclusa*
Plant Dis. Reprtr. 48: 102-103, 1964
183. WEATHERS, L.G.; SANCHEZ, L.; PLATT, R.G.:
Naturaleza y distribucion de las enfer-
medades virosas de citricos en Chile
Agric. Tecnica 29: 166-169, 1969
184. WEATHERS, L.G.; PAULUS, A.O.; HARJUNG, M.K.:
Effect of soil temperature on the deve-
lopment of exocortis in *Poncirus trifol-*
liata
Phytopathology 52: 32, 1962
185. WEATHERS, L.G.: Yellow-vein disease of citrus and
studies of the interaction between
yellow-vein and other virus of citrus
Virology II: 753-764, 1960
186. WEITBRECHT, D.: Reinigung und Anreicherung von Nuclein-
säuren durch sterische Chromatographie
an Glas mit kontrollierter Porengröße
Diplomarbeit Univ. Gießen, 1973
187. WERNER, H.O.: Relation of time of roguing to the
spread of spindle tuber in seed potato
plants
Phytopathology 19: 1045-1049, 1929
188. WHITNEY, E.D.; PETERSON, L.C.: An improved technique
for inducing diagnostic symptoms in
tomato infected by potato spindle tuber
virus
Phytopathology 53: 893, 1963
189. VOGEL, R.: Note sur la presence des maladies à virus
des agrumes en Corse
Fruits d'Outre Mer 16: 137-142, 1961
190. VOGEL, R.; BOVE, J.M.: Réactions de quelques porte-
greffe à l'exocortis
Fruits d'Outre Mer. 26: 295-300, 1971
191. ZAITLIN, M.; HARIHARASUBRAMANIAN, V.: Proteins
in tobacco mosaic virus - and potato-
spindle tuber virus infected in plants
Phytopathology 60: 1537-1538, 1970

192. ZAITLIN, M.; HARIHARARASUBRAMANIAN, V.: A gel electrophoretic analysis of proteins from plants infected with tobacco mosaic and potato spindle tuber viruses
Virology 47: 296-305, 1972
193. LOENING, U.E.: Molecular weight of ribosomal RNS in relation to evolution
J. Mol. Biol. 38: 355-365, 1968
194. SEMANCIK, J.S., D.S. MAGNUSON & L.G. WEATHERS:
Potato Spindle Tuber Disease Produced by Pathogenic RNS from Citrus Exocortis Disease: Evidence for the identity of the causal Agents
Virology 52: 292-294, 1973

Herrn Professor Dr. H.L. Sänger möchte ich für die Überlassung des Themas, die vielfältige Unterstützung und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Singh, Frau Ramm und Frau Muth für ihre Mithilfe und ihre Ratschläge bei der Durchführung verschiedener Arbeitstechniken. Für die Anzucht der Wirts- und Testpflanzen und für die Betreuung der Versuche im Gewächshaus bin ich ganz besonders Frau Schlag und auch Herrn Größer zu Dank verpflichtet.

Ferner danke ich allen Angehörigen des Instituts für Phytopathologie für die freundliche Aufnahme und für die vielen kleinen Hilfen während meines Aufenthaltes.

Schließlich möchte ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung danken, durch die mir und meiner Familie der Aufenthalt in Deutschland ermöglicht wurde.

LEBENS LAUF

Am 14. Mai 1943 wurde ich, Enrique Buchner, als Sohn des Diplomlandwirtes Enrique Buchner und dessen Ehefrau Electra, geb. Boettcher, in Santiago (Chile) geboren.

- 1949 - 1954 : Besuch der Grundschule
- 1955 - 1961 : Besuch der Oberschule
- 1962 - 1967 : Agrarwissenschaftsstudium an der Universidad Católica de Valparaíso (Chile),
Abschluß als Técnico Agrario (B.Sc)
1966 und 1967 Abschluß des Ingeniero Agrónomo (Diplomagraringenieur)
- 1967 : Technischer Leiter der Pflanzenschutz-
abteilung bei Bayer Chile S.A.
- 1968 - 1971 : Ministerium für Landwirtschaft (Chile)
als Projektleiter für Weinbau
- 1971 - 1972 : DAAD-Stipendiat an der Christian Albrecht-
Universität (Kiel), am Institut für
Phytopathologie
- 1972 - 1974 : Als Doktorand in der Arbeitsgruppe Pflanzenvirologie des Instituts für Phytopathologie der Justus Liebig-Universität (Gießen),
mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

